

Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene während der Hyphenbildung in *Malassezia furfur* mittels cDNA-Subtraktionsverfahren

ILKA SIMON

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Betreuer: Prof. em. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

und

aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. Peter Mayser

**Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter
Gene während der Hyphenbildung in *Malassezia furfur* mittels
cDNA- Subtraktionsverfahren**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ilka Simon

Tierärztin aus Dortmund

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. em. Dr. Dr. habil. Georg Baljer
Prof. Dr. med. Peter Mayser

Tag der Disputation: 02.04.2014

Für meine geliebte Familie

Abkürzungsverzeichnis

Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
as	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Copy DNA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Gly	Glycin
h	Stunde
l	Liter
LB	Luria Bertani
μ	mikro
m	milli
mDixon	Modifizierter Dixon Agar
n	nano
M	Mol
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
OVV	Oberflächen-Volumen-Verhältnis
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PV	Pityriasis versicolor
PVc	Pityriasis versicolor chromians
PVa	Pityriasis versicolor alba
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	(Sodium) Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Seq	Sequenz

SSC	Saline-Sodium Citrate
ss	einzelsträngig
TE	Tris-EDTA
Trp	Tryptophan
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
z.B.	Zum Beispiel

Folgende Teile der Disputation wurden bereits veröffentlicht:

Abstract (Poster):

I. Simon, W. Hort, S. Lang, P. Mayser.

Identification and characterization of differentially expressed genes associated with the production of hyphae in *Malassezia furfur* by cDNA- subtraction technology.

Mycoses 53: 403, 2010 (Poster)

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Gattung <i>Malassezia</i>	2
1.1.1 Differenzierung der verschiedenen <i>Malassezia</i> -Spezies	2
1.1.2 Taxonomie	3
1.1.3 Epidemiologie	4
1.1.4 Morphologie und Physiologie	5
1.1.5 Molekularbiologie	6
1.2 Die Erkrankung Pityriasis versicolor	6
1.2.1 Krankheitsbild	6
1.2.2 Diagnostik.....	7
1.2.3 Epidemiologie der Pityriasis versicolor	8
1.3 Die Pathogenese der Pityriasis versicolor.....	9
1.3.1 Hyphenbildung bei den verschiedenen <i>Malassezia</i> -Hefen.....	12
1.3.2 Hyphenbildung in der Kultur	15
2 Hintergrund und Fragestellung	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Materialien	23
3.2 Geräte	33
3.3 Methoden	36
3.3.1 Verwendete Referenzstämme	36
3.3.2 Anzucht und Kultivierung von <i>Malassezia</i> -Hefen	36
3.3.3 DNA- und RNA-Isolierung	40

3.3.4 Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (cDNA-Subtraktion)	47
3.3.5 Klonierung in <i>E. coli</i>	54
3.3.6 Reverser Northern Blot	56
3.3.7 DNA-Plasmid Mini-Preparation	59
3.3.8 Sequenzierung	61
4 Ergebnisse	64
4.1 Wachstum und Kultivierung von <i>Malassezia</i>-Hefen.....	64
4.1.1 Fütterungsversuche und Hyphenwachstum der <i>Malassezia</i> -Hefen.....	64
4.2. Molekulargenetische Versuche	70
4.2.1 Gesamt RNA- Isolierung	70
4.2.2 mRNA- Isolierung.....	70
4.2.3 cDNA-Subtraktionsverfahren	70
4.2.4 Klonierung der subtrahierten cDNA	72
4.2.5 Screening der Sequenzen nach 6 Stunden.....	73
4.2.6 Sequenzierung, Blast-Suche und Sequenzanalyse	74
4.2.7 Funktionelle Einteilung der Sequenzen	86
4.2.8 Einordnung der gefundenen Gene zu Funktionen und in hyphenassoziierte Stoffwechselwege	87
5 Diskussion	91
6 Zusammenfassung.....	107
7 Summary	109
Literaturverzeichnis.....	111

1 Einleitung

Die Pityriasis versicolor und ihre depigmentierte Variante (Pityriasis versicolor alba) repräsentieren zusammen eine der häufigsten menschlichen Hauterkrankungen weltweit (Hay et al., 1998; t und Mayser, 2011). Es handelt sich um eine chronische oberflächliche Pilzinfektion mit gehäuftem Auftreten im Bereich des Oberkörpers (Faergemann und Fredriksson, 1982). Die Erkrankung wird durch *Malassezia*-Hefen hervorgerufen, insbesondere in hiesigen Breiten durch *Malassezia globosa* (Crespo Erchiga et al., 2000; Crespo-Erchiga und Florencio, 2006; Gaitanis et al., 2006). In tropischen Gebieten wiederum spielt *Malassezia furfur* eine übergeordnete Rolle (Razanakolona et al., 2004; Miranda et al., 2006). Die Hefen der Gattung *Malassezia* gehören gleichzeitig zur residenten Hautflora des Menschen (Roberts, 1969). Es konnten bisher 14 Spezies aufgrund ihrer morphologischen, biochemischen, sowie ihrer molekularbiologischen Eigenschaften identifiziert werden. Die Pityriasis versicolor ist gekennzeichnet durch hyper- und depigmentierte Läsionen der Haut, eine Fluoreszenz dieser Bezirke im Licht der Woodschen Lampe bei 366 nm, eine Unempfindlichkeit depigmentierter Areale gegenüber UV-Strahlung, eine kleieförmige Schuppung und das Auftreten von Hefezellen und Hyphen im Nativpräparat aus Schuppen der läsionalen Hautbezirke. Wenn auch Eichstedt bereits 1846 über das Vorkommen von Hefezellen und Filamenten in Schuppen aus betroffenen Hautbereichen berichtet, wirft die Erkrankung bis heute viele Fragen auf. Insbesondere ihre Pathogenese ist immer noch nicht geklärt. Die wichtigsten pathologischen Auswirkungen der *Malassezia*-Hefen sind nach dem momentanen Kenntnisstand auf lipolytische Aktivitäten, den speziellen Zellwand-Aufbau, die Hyphenbildung und die kürzlich beschriebene Tryptophan-abhängige Herstellung von Pigmenten zurückzuführen (Hort und Mayser, 2011).

Diese Arbeit befasst sich mit der Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* und der Identifizierung von Genen, die mit der Hyphenbildung in Zusammenhang stehen könnten. Die Untersuchungen sollen demnach einen Beitrag zum besseren Verständnis des Ablaufes der Hyphenbildung und zur weiteren Aufklärung der Pathogenese der Pityriasis versicolor leisten.

1.1 Die Gattung *Malassezia*

1.1.1 Differenzierung der verschiedenen *Malassezia*-Spezies

Zur Zeit werden 14 verschiedene Spezies der Gattung *Malassezia* unterschieden, *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yamatoensis*, *M. equina*, *M. caprae*, *M. cuniculi* und *M. pachydermatis* (Cabañes et al., 2011; Cabañes et al., 2007; Guého et al., 1996a; Hirai, 2004; Sugita et al., 2004; Sugita et al., 2003; Sugita et al., 2002). Die Differenzierung der verschiedenen Spezies lässt sich durch morphologische, biochemische und molekularbiologische Methoden verwirklichen. Tabelle 1 zeigt die momentane Einteilung der verschiedenen *Malassezia*-Spezies und ihre Erstbeschreiber.

Tabelle 1: Einteilung der 14 verschiedenen *Malassezia*-Spezies

* kennzeichnet die Spezies, die nur anhand molekularbiologischer Methoden als eigenständige Spezies identifiziert wurden

<i>Malassezia</i> -Spezies	Erstbeschreiber	Referenzstamm (CBS)
<i>M. furfur</i>	Baillon, 1889	CBS 1878
<i>M. pachydermatis</i>	Dodge, 1935	CBS 1879
<i>M. sympodialis</i>	R. B. Simmons & Eveline Gueho, 1990	CBS 7222
<i>M. globosa</i>	Guého, G Midgley, & Guillot, 1996a	CBS 7966
<i>M. obtusa</i>	Guého, G Midgley, & Guillot, 1996a	CBS 7976
<i>M. restricta</i>	Guého, G Midgley, & Guillot, 1996a	CBS 7877
<i>M. slooffiae</i>	Guého, G Midgley, & Guillot, 1996a	CBS 7956
<i>M. dermatis</i> *	Sugita et al., 2002	CBS 9169
<i>M. japonica</i> *	Sugita et al., 2003	CBS 9431
<i>M. yamatoensis</i> *	Sugita et al., 2004	CBS 9725
<i>M. nana</i> *	Hirai, 2004	CBS 9557
<i>M. equina</i> *	Cabañes et al., 2007	CBS 9969
<i>M. caprae</i> *	Cabañes et al., 2007	CBS 10434
<i>M. cuniculi</i> *	Cabañes et al., 2011	CBS 11721

1.1.2 Taxonomie

Die Mitglieder der Gattung *Malassezia* können aufgrund ihrer morphologischen Strukturen nur schwer höheren taxonomischen Ebenen zugeordnet werden. Eine erste Zuordnung zum Stamm der Basidiomycota gelang anhand verschiedener Charakteristika wie Zellwandaufbau und der Diazoniumblaureaktion (Simmons und Ahearn, 1987). Ein besseres Verständnis für die stammesgeschichtlichen Beziehungen der *Malassezia*-Hefen wurde erst mit Hilfe von ribosomalen DNA (rDNA) - Sequenzdaten ermöglicht (Guillot und Guého, 1995). Allerdings kann die Gattung *Malassezia* noch keiner bestimmten Klasse zugeordnet werden. Die aktuellste taxonomische Klassifizierung teilt die Ordnung der *Malasseziales* dem Unterstamm der *Ustilaginomycotina* und keiner genauen Klasse *incertae sedis* zu (Hibbett et al., 2007). Abb. 1 stellt die aktuellste taxonomische Einteilung der Gattung *Malassezia* dar.

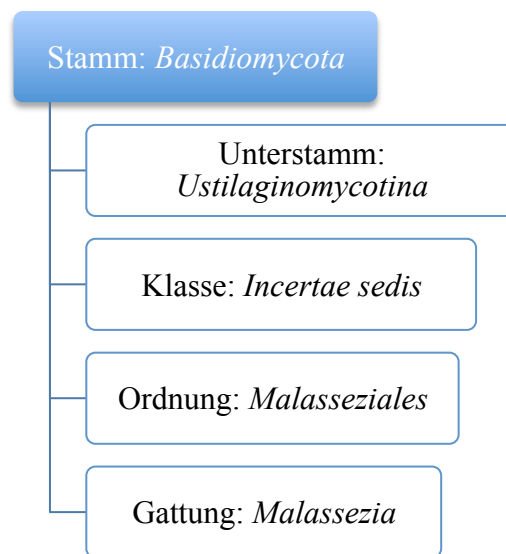


Abbildung 1: Taxonomische Einteilung der Gattung *Malassezia* (Hibbett et al., 2007)

1.1.3 Epidemiologie

Generell sind die *Malassezia*-Hefen Teil der symbiontischen Hautflora und bis auf *Malassezia pachydermatis* obligat lipidabhängig. Ihre Verteilung auf der Haut beschränkt sich wegen ihrer Lipidabhängigkeit hauptsächlich auf die talgdrüsen- und lipidreichen Bereiche der Körperoberfläche. Solche Körperstellen sind z.B. die vordere und hintere Schweißrinne an Brust und Rücken, der behaarte Kopf, der äußere Gehörgang, die Stirn und die Nasolabialrinne, wobei sich an den Extremitäten außer der Ellenbeuge kaum *Malassezia*-Hefen befinden (Faergemann et al., 1983b; Leeming et al., 1989; Roberts, 1969). Die Keimzahldichte variiert je nach Alter und der damit verbundenen unterschiedlichen Talgproduktion und Feuchtigkeit auf der Haut. Bei Neugeborenen und Kleinkindern ist die Keimzahl noch gering, während sie mit der Pubertät stark ansteigt (Faergemann und Fredriksson, 1980; Noble und Midgley, 1978). Die höchste Keimzahldichte tritt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf, da hier die Talgdrüsen die größte Aktivität zeigen. Im Alter nimmt die Talgproduktion hingegen wieder ab, wodurch dann auch die Keimzahldichte wieder geringer ausfällt (Bergbrant und Faergemann, 1988; Cunningham, Ingham und Gowland, 1996). Auf gesunder menschlicher Haut kommen vor allem *Malassezia globosa*, *Malassezia sympodialis* und *Malassezia restricta* vor (Aspiroz et al., 1999; Nakabayashi et al., 2000; Paulino et al., 2008; Tarazooie et al., 2004). Allerdings gibt es bei der Verteilung der *Malassezia*-Spezies Schwankungen abhängig von den einzelnen ethnischen Gruppen oder der geographischen Lage. *Malassezia pachydermatis* wird hauptsächlich bei Tieren gefunden, wo in diesem Zusammenhang hauptsächlich die Haut oder der äußere Gehörgang befallen sind (Gustafson, 1960; Baxter, 1976; Chen und Hill, 2005). Auch die lipidabhängigen *Malassezia*-Spezies wurden bereits bei Tieren gefunden und isoliert, obwohl sie sehr viel häufiger auf menschlicher Haut nachweisbar sind (Bond et al., 1996; Bond et al., 1997; Crespo et al., 2002a; Crespo et al., 2002b; Gandra et al., 2008; Garau et al., 2005; Hirai, 2004; Nardoni et al., 2004; White et al., 2006).

1.1.4 Morphologie und Physiologie

Die verschiedenen *Malassezia*-Spezies zeichnen sich durch eine gewisse Varianz in ihrem mikroskopischen Erscheinungsbild aus. So finden sich runde (2,5-5µm im Durchmesser), sowie ovale bis hin zu zylindrischen Sproßzellen (Breite: 1,5-3µm, Länge: 2,5-8µm)(Guého et al., 1996; Mayser et al., 2008). Des Weiteren ist die Zellwand aller *Malassezia*-Spezies sehr dick (0,12µm), weist einen spiraligen Aufbau auf und gliedert sich in eine Außenlamelle, eine mehrschichtige multilamellös untergliederte Wand und in die Plasmamembran (Breathnach et al., 1976; Keddie, 1966; Mittag, 1995; Swift und Dunbar, 1965). Die Zellwand besitzt zudem einen sehr viel höheren Lipidanteil (15%), im Gegensatz zu anderen Hefen, wie zum Beispiel *Saccharomyces* spp. (Mayser et al., 2008; Thompson und Colvin, 1970). Die *Malassezia*-Hefen vermehren sich durch monopolare oder sympodiale Sprossung, bei der eine Narbe, die sogenannte Colarette, am Knospengrund entsteht (Simmons und Ahearn, 1987; Simmons und Gueho, 1990). In der Kultur stellen sich die *Malassezia*-Kolonien auf dem Festmedium weiß bis cremefarben-gelblich dar. Sie verbreiten zudem einen fruchtig-hefigen Geruch, ohne Ausbildung von Luftmycel (Abbe, 1964; Labows et al., 1979). Mit Ausnahme von *Malassezia pachydermatis* benötigen die verschiedenen *Malassezia*-Spezies zum Überleben mittel- bis langkettige Fettsäuren, da sie obligat lipidabhängig sind. Optimal sind hierbei Fettsäuren mit mindestens 12 Kohlenstoffatomen (Ashbee und Evans, 2002; Benham, 1939; Mayser, Lang und Hort, 2008; Porro et al., 1976; Shifrine und Marr, 1963; Wilde und Stewart, 1968). Die *Malassezia*-Hefen können, bis auf *Malassezia pachydermatis*, keinen Zucker fermentieren (Benham et al., 1939; Sloof, 1970). Sie wachsen unter aeroben, mikroaeroben und auch anaeroben Verhältnissen (Faergemann und Bernander, 1981) und sind in der Lage, Ammoniumsalze und verschiedene Aminosäuren als Stickstoffquellen zu nutzen (Mayser et al., 1998a). Daher benötigen die *Malassezia*-Hefen zum Überleben in einem Minimalnährmedium lediglich eine Lipidquelle, sowie Salze und eine Aminosäure als Stickstoffquelle. Anhand von Unterschieden im Bereich der Stoffwechseleigenschaften, wie z.B. der Urease-, Katalase- und Beta-Glukosidaseaktivität, des Wachstums bei 37° und 40°C sowie der Assimilation verschiedener Fettsäuren kann man die einzelnen *Malassezia*-Spezies zum größten Teil identifizieren und unterscheiden (Guého et al., 1996a; Mayser et al., 1997a; Mayser et al., 1997b).

1.1.5 Molekularbiologie

Das Genom der *Malassezia*-Hefen war lange Zeit weitgehend unbekannt. Die erfolgreiche Sequenzierung des Genoms von *Malassezia globosa* und *Malassezia restricta* stellte diesbezüglich einen großen Fortschritt dar (Dawson, 2007; Xu et al., 2007). Neben *Malassezia furfur* ist für die Spezies *Malassezia globosa*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia restricta*, *Malassezia slooffiae* und *Malassezia sympodialis* ein Chitin-Synthase-Gen 2 bekannt (Kano et al., 1999). Für *Malassezia pachydermatis* ist außerdem noch ein Cytochrom-b-Gen bekannt (Biswas et al., 2001). Hinsichtlich *Malassezia furfur* selbst konnte vor einiger Zeit die Proteinsequenz einer Lipase entschlüsselt werden (Brunke und Hube, 2006). Des Weiteren gibt es, speziell für *Malassezia furfur*, zusätzliche Informationen zu den ITS-Regionen (internal transcribed Spacer) 1 und 2 (Makimura et al., 2000) und Gensequenzen für mehrere *Malassezia* Allergene (Mala f 2-4) (Lindborg et al., 1999; Onishi et al., 1999; Rasool et al., 2000; Schmidt et al., 1997; Yasueda et al., 1998). Ansonsten ist *Malassezia furfur* bisher kaum molekularbiologisch untersucht worden, und es sind für diese Hefe diesbezüglich auch wenig molekularbiologische Methoden etabliert.

1.2 Die Erkrankung Pityriasis versicolor

1.2.1 Krankheitsbild

Die Pityriasis versicolor wurde 1801 zum ersten Mal beschrieben und benannt (Willan, 1801). Sie ist die weltweit häufigste menschliche Hauterkrankung (Sunenshine et al., 1998) und wird durch *Malassezia*-Hefen verursacht (Gupta et al., 2002). Die PV kommt klinisch in zwei verschiedenen Varianten vor: als Pityriasis versicolor chromians, die Hyperpigmentierungen in einem breitem Farbspektrum aufweist, und als Pityriasis versicolor alba, die mit De- bzw. Hypopigmentierungen einhergeht (Crespo-Erchiga und Florencio, 2006; Gupta et al., 2002; Thoma et al., 2005). Die erstere Form (PVc) ist gekennzeichnet durch rundlich-ovale, teils konfluierende makulöse Hyperpigmentierungen der Haut, die in den talgdrüsenreichen Bereichen von Brust, Rücken und Gesicht auftreten (von Gudden, 1853) und die eine gelbe, rötliche oder bräunliche, bis hin zu einer schwarzen Farbe zeigen können (Ruete, 1928; Sunenshine et al., 1998; Gupta et al., 2002; Gupta et al.,

2003; Thoma, 2005). Die hyperpigmentierten Areale weisen zudem eine pityriasiforme oder auch kleieförmige Schuppung auf, die sich leicht vom Untergrund abstreifen lässt und als Hobelspanphänomen bezeichnet wird (Besnier und Balzer, 1882). Ein anderes charakteristisches Merkmal ist die gelb-orange bis grünliche Fluoreszenz der betroffenen Areale im Licht der Wood'schen Lampe bei einer Wellenlänge von 366nm (Mayser et al., 1998). Dieses Phänomen lässt sich auch in klinisch noch unauffälligen Bereichen beobachten, was einen Hinweis auf die Ausbreitung der Erkrankung liefert (Gupta et al., 2002). Die depigmentierte Form (PVa) zeigt sich in der Regel spontan besonders unter Einfluss von UV-Licht nach Abheilung der hyperpigmentierten Form und zeichnet sich durch scharf begrenzte, gleichmäßig hypopigmentierte Flecken unterschiedlichen Durchmessers aus (Adamson, 1949; El-Gothamy et al., 1975; Lockshin, 1973; Thoma et al., 2005). Die PVa kann aber auch nach Abheilung der PVc ausbleiben (El-Gothamy et al., 1975), oder gleichzeitig mit ihr in Erscheinung treten (Ruete, 1933; Sunenshine et al., 1998). Zudem kann sie ebenfalls ohne das hyperpigmentierte Stadium auftreten. Teilweise werden die Hypo- bzw. Depigmentierungen auf schwarzer Haut als eigenständige Variante der Erkrankung beschrieben (Jeliffe et al., 1954; Marples, 1950; Pardo-Castello, 1932). Bei der PVa fehlt meist die pityriasiforme Schuppung (Lockshin, 1973; Thoma et al., 2005). Charakteristisch für diese Variante ist eine Unempfindlichkeit der hellen fleckigen Haut gegenüber Sonnenbrand und UV-Strahlung (Kistiakovsky, 1927; Larangeira de Almeida und Mayser, 2006; Ruete, 1933; Wertheim, 1928). Die hypopigmentierten Areale bleiben häufig über Monate bestehen und sind auf gebräunter und dunkler Haut besonders deutlich. Gelegentlich tritt Juckreiz bei entzündlichen Formen auf, insbesondere bei stärkerem Schwitzen. (Borelli et al., 1991; Crespo-Erchiga und Florencio, 2006; Gupta et al., 2002; Götz, 1962). Die Erkrankung wird in der Regel aus kosmetischen Gründen als Problem empfunden (Gupta et al., 2002). Ursachen hierfür sind die hohe Rezidivrate und die lang anhaltenden Depigmentierungen.

1.2.2 Diagnostik

Anhand der typischen Erscheinung der PV lässt sich die Diagnose in der Regel bereits klinisch stellen. Man erkennt sie an den typischen Läsionen wie kleieförmiger Schuppung, dem Hobelspanphänomen und der Fluoreszenz im Wood-Licht bei

366nm. Die klinisch getroffene Diagnose muss aber immer durch den mikroskopischen Pilznachweis im Nativpräparat aus läsionalem Schuppenmaterial abgesichert werden. Hierzu wird das Präparat zu gleichen Teilen mit 10-20% KOH-Lösung und Parker Tinte (permanent blau-schwarz) angereichert. Dadurch färben sich die Pilze gut sichtbar blau an und lassen das charakteristische mikroskopische Bild von breiten, kurzen, segmentierten Hyphen (2,5-5x25µm) und traubenartigen Sporenhäufchen aus 10-30 runden Sproßzellen (bis 8µm) erkennen, die auch als „Spaghetti und Fleischklößchen“ bezeichnet werden. Auf gesunder Haut würden sich in der Mikroskopie vorwiegend Sprosszellen der *Malassezia*-Hefen finden. Zu 6-7% kommen Hyphen zwar auch auf gesunder Haut vor (McGinley et al., 1975). Allerdings finden sie sich weitaus seltener als auf erkrankter Haut, sodass das positive Nativpräparat bei entsprechender Klinik den entscheidenden Hinweis gibt.

Für die Diagnose ist die Anlage einer Pilzkultur nicht aussagekräftig (Crespo-Erchiga et al., 2010). Zum einen gehören *Malassezia*-Hefen zur residenten Hautflora. Daher wird man sie in der Kultur immer vorfinden. Und zum anderen kommt es in Kultur nicht zur Ausbildung des Hyphenstadiums. Um allerdings die einzelnen *Malassezia*-Spezies anhand ihrer unterschiedlichen Stoffwechselleistungen identifizieren zu können, ist sie durchaus von Bedeutung, wie z.B. bei der Assimilation verschiedener Fettsäuren (Guého et al., 1996a; Mayser et al., 1997a; Mayser et al., 1997b). Auch Hautbiopsien sind nur selten für die Diagnose der PV von Bedeutung (Crespo-Erchiga und Hay, 2010). Differentialdiagnostisch kann man von der PVc unter anderem das Erythrasma, das Chloasma, die Pityriasis rosea, die Tinea corporis und das Sekundärstadium der Syphilis unterscheiden. Differentialdiagnosen zur PVa sind die Pityriasis alba, der Vitiligo und, in tropischen Ländern, die Depigmentierungen der Lepra (Olumide et al., 1990).

1.2.3 Epidemiologie der Pityriasis versicolor

Obwohl die PV eine der häufigsten oberflächlichen Hautpilzerkrankungen ist, ist über die Epidemiologie dieser Erkrankung, bis auf allgemeine Fakten, nur sehr wenig veröffentlicht worden. Es gibt nur wenige große Studien, die detaillierte Zahlen über die Prävalenz von Hauterkrankungen zur Verfügung stellen (Crespo-Erchiga und Hay, 2010). Das Klima trägt hierbei entscheidend zum Auftreten der Erkrankung bei, was man an der geografischen Verteilung erkennen kann. Die Prävalenz der Pityriasis

versicolor beträgt im tropischen und subtropischen Raum bis zu 50% (Marples, 1950). Im Gegensatz dazu erkranken in den gemäßigten Breiten nur bis etwa 3% der dermatologischen Patienten, wobei die stärkste Erkrankungsrate im Sommer auftritt (Ashbee und Evans, 2002; Crespo-Erchiga und Florencio, 2006; Gupta et al., 2003; Sunenshine et al., 1998). Ähnlich wie das Makroklima spielt auch das Mikroklima eine Rolle. Bei anlagebedingter Hyperhidrose (Razack und Thambia, 1977), dem Tragen okkludierender Kleidung (Gupta et al., 2002; Ruete, 1933), sowie dem Auftragen fetthaltiger Kosmetika kommt es zu einem feucht-warmen Milieu, Änderungen der CO₂-Spannung und des pH-Wertes auf der Haut (Faergemann und Bernander, 1979, 1989a; Gupta et al., 2002; King et al., 1978; Sunenshine et al., 1998). Auch viel Sport scheint sich begünstigend auf die Entstehung der Erkrankung auszuwirken, aber ob dies auf übermäßiges Schwitzen zurückzuführen ist, ist noch unklar (Conklin, 1990; McDaniel, 1977). In Bezug auf das Erkrankungsalter ist es so, dass die Pityriasis versicolor am häufigsten bei Teenagern und jungen Erwachsenen beider Geschlechter vorkommt. Denn bei diesen Altersklassen ist die Talgproduktion am höchsten und die *Malassezia*-Hefen finden, aufgrund ihrer Lipidabhängigkeit, hier die günstigsten Bedingungen vor (Burke, 1961; Crespo-Erchiga und Florencio, 2006; Gupta et al., 2002). Man nimmt an, dass die PV genetisch verankert ist, da die Erkrankung bei manchen Familien gehäuft auftritt, besonders bei Familienmitgliedern ersten Grades (Hafez und el-Shamy, 1985). Weitere Faktoren, die die Erkrankung begünstigen, sind der Literatur nach Mangelernährung (Stein, 1983), die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Borelli et al., 1991), manche Erkrankungen, wie z.B. die viszerale Leishmaniose (Hashim und Elhassan, 1994), die systemische Gabe von Kortikosteroiden und immunsupprimierenden Substanzen (Ashbee und Evans, 2002; Burke, 1961; Gupta et al., 2002; Gupta et al., 2004). Allerdings konnte im Gegensatz zu anderen Pilzerkrankungen keine Verbindung der PV in Bezug auf immunsupprimierende Erkrankungen wie HIV/AIDS gefunden werden (Aly und Berger, 1996; Crespo-Erchiga und Hay, 2010).

1.3 Die Pathogenese der Pityriasis versicolor

Bis zum heutigen Tag ist noch nicht vollständig geklärt, welche der *Malassezia*-Spezies der eigentliche Auslöser der PV ist. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass in gemäßigten Breiten *Malassezia globosa* als der eigentliche Auslöser der

Pityriasis versicolor gilt und somit die klinischen Läsionen der PV verursachen soll (Aspiroz et al., 2002; Crespo-Erchiga et al., 2000; Dutta et al., 2002; Gaitanis et al., 2006; Hernández et al., 2003; Karakaş et al., 2009; Morishita und Sei, 2006; Nakabayashi et al., 2000; Prohic und Ozegovic, 2007; Salah et al., 2005; Tarazooie et al., 2004). In tropischen Klimazonen tritt *Malassezia furfur* in den Vordergrund und scheint in diesen Regionen bei der PV die entscheidende Rolle zu spielen (Dutta et al., 2002; Krisanty et al., 2008; Miranda et al., 2006). Die dominierende Existenz von *M. furfur* bei der PV in den Tropen und von *M. globosa* bei der PV in den gemäßigten Klimazonen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die PV je nach geographischer Lage durch mehr als nur einen Pilz verursacht werden kann (Crespo-Erchiga und Hay, 2010). Auch *Malassezia sympodialis* wurde bereits als möglicher Erreger der PV diskutiert (Gupta et al., 2001).

Der Zusammenhang zwischen den Pigmentierungen und Depigmentierungen und der Pathogenese der PV ist noch nicht vollständig geklärt (Gupta et al., 2003). Allerdings sind bereits sekundäre Stoffwechselwege bekannt, die die Produktion von Melanin beeinflussen und in einem breiten Spektrum von Indol-Verbindungen resultieren. Die biochemischen Eigenschaften dieser Verbindungen könnten teilweise die Pathogenese der Pityriasis versicolor erklären (Hort und Mayser, 2011). Älteren Annahmen nach könnten die Hyperpigmentierungen aus einer entzündlichen Reaktion (Dotz et al., 1985; Galadari, 1998; Hay et al., 1998), aufgrund von abnormen Melanosomen und Melanozyten (Allen et al., 1976; Charles et al., 1973; Karaoui et al., 1981), oder auf ein verdicktes Stratum corneum und die Existenz zahlreicher Pilzelemente in den Läsionen zurückzuführen sein (Galadari, 1998; Karaoui et al., 1981). Allerdings bieten diese Ansätze keine Erklärung für die Fluoreszenz der pigmentierten Areale im UV-Licht. Für die Entstehung der Pityriasis versicolor alba wurde lange Zeit angenommen, dass das UV-Licht durch die Schuppen- und Pilzauflagerungen gefiltert wird und die Hypopigmentierungen somit als Pseudoleukoderm zu sehen sind (Kristiakovsky, 1927; Wertheim, 1928). Mittlerweile geht man allerdings von einem echten Leukoderm aus, da die Depigmentierungen auch auf nicht belichteter sowie auf schwarzer Haut auftreten (Blumenthal, 1971; Jelliffe und Jacobson, 1954; Nia und Smith, 1979; Smith, 1978). Die Annahme der physikalischen Filterwirkung scheint somit obsolet zu sein. Es wird angenommen, dass es zu einer generellen Beeinflussung der Melanogenese durch den Erreger und seiner Metabolite kommt,

was durch histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen gestützt wird (El-Gothamy et al., 1975; Galadari et al., 1992). Eine neue Möglichkeit, die charakteristischen Symptome der Pityriasis versicolor zu erklären, bietet der von Mayser et al. beschriebene Tryptophan-abhängige Pigmentstoffwechsel (Mayser und Pape, 1998). Bei diesen Untersuchungen bildete ausschließlich *Malassezia furfur* ein braunes Pigment, das in den Agar diffundierte, wenn der Pilz auf einem Minimalnährmedium, bestehend aus einer Lipidquelle und L-Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle, inkubiert wurde (Mayser et al., 1998b). Die Eigenfarbe der einzelnen isolierten Pigmente und Fluorochrome sowie die bräunlich-rötliche Eigenfarbe des Extraktes könnten hierbei einzelne klinische Erscheinungsformen der Pityriasis versicolor erklären (Mayser und Pape, 1998). Zudem bildet *Malassezia furfur* mit Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle komplexe Indolverbindungen aus, die für die Pathogenese der PV von Wichtigkeit sein können. Malassezin zum Beispiel ist ein Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR)-Agonist, der eine Dosis-abhängige Apoptose in menschlichen Melanozyten induzieren kann und somit zu einer Depigmentierung führen könnte (Krämer et al., 2004; Krämer et al., 2005b; Thoma, 2003; Wille et al., 2001). Eine Erklärung für die nicht erhöhte UV-Empfindlichkeit in depigmentierten Bereichen könnte das Pityriacitrin sein, welches zu einer Filterung von UV-Strahlen fähig ist (Gambichler et al., 2007; Machowinski et al., 2006; Mayser und Pape, 1998; Mayser et al., 2002). Das Fluorchrom Pityrialacton wiederum könnte für die Fluoreszenz der betroffenen Hautareale im Wood-Licht verantwortlich sein (Mayser et al., 2008). Die isolierten Pityriarubine A, B und C sind selektive Hemmstoffe des granulozytären Bursts und wären daher eine Erklärung für das gering entzündliche Infiltrat in den Läsionen (Krämer et al., 2005a). Neueste Untersuchungen konnten höchstwahrscheinlich das Gen *mf_tam1* identifizieren das eine tryptophanabhängige Aminotransferase aus *Malassezia furfur* kodiert und damit für genau diese tryptophanabhängige Pigmentbildung verantwortlich ist. Diese Annahmen werden durch Untersuchungen an dem nahe verwandten Organismus *Ustilago maydis* gestützt (Zuther et al., 2008). Darüber hinaus wird die Pigmentsynthese von *Malassezia furfur in vitro* durch den TAM1-Hemmstoff Cycloserin deutlich gehemmt, was die oben genannten Ergebnisse zusätzlich unterstreicht (Mayser und Rieche, 2009; Vöhrs, 2010).

Neben der Pigmentbildung gibt es einen weiteren möglichen Virulenzfaktor, der für die Krankheitsentstehung von enormer Wichtigkeit sein könnte. Bei diesem handelt es sich um die Hyphenbildung auf den erkrankten Hautarealen. Die Hyphenbildung erscheint auf erkrankter Haut zu 100%, auf nicht läsionaler Haut zu 50% und am Stamm zu 42% (McGinley et al., 1970). Auf gesunder Haut sind Hyphen zu 6-7% zu finden (McGinley et al., 1975). Da die Hyphenform des Pilzes auf erkrankter Haut weitaus häufiger vorkommt als auf gesunder Haut und in den Schuppen der läsionalen Bezirke zudem ausreichend Hyphen vorhanden sind, geht man davon aus, dass die Hyphenbildung zur Pathogenese der PV beiträgt (Gordon, 1951a). In diesem Zusammenhang würden die Hyphen, wie oben bereits beschrieben, einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellen. Die Gründe für die Umwandlung der Hefeform in die Hyphenform sind bisher noch unklar, allerdings scheint dieser Dimorphismus durch verschiedene Faktoren wie Hitze, Feuchtigkeit, okklusive Kleidung und die Schweiß-Zusammensetzung verstärkt zu werden (Crespo-Erchiga und Hay, 2010). Die Induktion von Hyphenwachstum ist bei einzelnen *Malassezia*-Spezies *in vitro* möglich und in der Vergangenheit auch schon geglückt (siehe Kapitel 1.3.2), allerdings ist die Hypheninduktion schwierig und an komplexe Kulturbedingungen geknüpft (Nazarro-Porro et al., 1977; Saadatzadeh et al., 2001).

1.3.1 Hyphenbildung bei den verschiedenen *Malassezia*-Hefen

Die wichtigsten Merkmale von *Malassezia*-Hefen mit pathogenen Auswirkungen umfassen lipolytische Aktivitäten, den speziellen Zellwandaufbau, die Hyphenbildung und die seit einigen Jahren bekannte Tryptophan-abhängige Pigment-Produktion (Hort und Mayser, 2011). Diese Arbeit befasst sich in diesem Zusammenhang mit der Hyphenbildung. Zur Hyphenbildung sind nach heutigem Kenntnisstand nur einige *Malassezia*-Spezies fähig. Die Hyphen wurden 1995 bereits als Pseudohyphen erkannt, da sie keine Septierung aufweisen, welche die eigentliche Hyphe aufteilen (Guillot und Guého, 1995). Spontane Pseudohyphen-Bildung kann bei manchen Stämmen von *Malassezia furfur* vereinzelt beobachtet werden. Diese Funktion scheint bei dieser Spezies eine stabile Charaktereigenschaft zu sein. Pseudohyphen können auch nach Kultivierung unter besonderen Milieubedingungen auftreten (Boekhout et al., 2010). So wird bei Kultivierung von *Malassezia furfur* auf modifiziertem Dixon Agar (mDA) über eine gelegentliche Bildung von Pseudohyphen berichtet (Boekhout

et al., 2010). Der mDA besteht aus 12-15 g Agar, 36 g Malzextrakt, 10 g Pepton, 20g Ochsen-galle, 10 ml Tween 40, 2 ml Glycerol, 2 g Ölsäure und 0,5 g Cycloheximid, gelöst in 1 l destilliertem Wasser und einem pH von 6. Im Gegensatz zu *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. sloofiae* und *M. sympodialis* ist *M. furfur* in der Lage, Glycin als Stickstoffquelle für sich zu nutzen (Murai et al., 2002). In der Studie von Murai et al. wuchsen alle *Malassezia-furfur*-Stämme auf reinem Glycin- Medium mit 7-266 mmol Glycin und konnten Glycin in 7 mmolarer Konzentration assimilieren, während die anderen *Malassezia*-Arten gar nicht auf dem Glycin-Medium wuchsen. Auch auf modifiziertem Dixon-Medium mit 7 mmol Glycin wuchs *Malassezia furfur* schnell, während die anderen *Malassezia*-Arten auf diesem Medium nur langsam und schwach wuchsen (Murai et al., 2002). Das Glycin-Medium in der Arbeit von Murai et al. bestand aus 2% Agar, der sich aus 7, 13, 67, 133, oder 266 mmol Glycin, 7,4 mmol KH₂PO₄, 4,1 mmol MgSO₄7H₂O und 29,6 mmol Thiamin zusammensetzte. Das modifizierte Dixon-Glycin-Medium mit 2% Agar, setzte sich aus einer Glycinkonzentration von 7 mmol, 0,6% Pepton, 3,6% Malzextrakt, 2% Ochsen-galle, 1% Tween 40, 0,2% Glycerol und 0,2% Ölsäure zusammen. Die Hefen wurden nach Aufbringen auf das Medium für 7-14 Tage bei 30°C inkubiert (Murai et al., 2002). Die einzelnen Kulturbedingungen, die bei *Malassezia furfur* eine Hyphenbildung auslösen konnten, werden in Kapitel 1.3.2 noch genauer beschrieben. Bei *Malassezia globosa* können nach 7 Tagen Inkubation bei 32°C auf modifiziertem Dixon-Agar 4 mm große, erhabene, gefaltete und raue Kolonien beobachtet werden. Die Hefezellen selber sind kugelförmig mit einem Durchmesser von 2,5-8µm und einer Knospenbildung auf schmaler Basis (Guého et al., 1996). Kurze Pilzfäden können manchmal am Ursprung des Knospengrundes beobachtet werden (Guého et al., 1996). Bei *Malassezia globosa* erinnern die kurzen Filamente an die Keimschläuche von *Candida albicans*. Sie kommen vor allem in primären Kulturen vor, die direkt von der Pityriasis versicolor isoliert wurden (Guého et al., 1996). In einer Studie von Roberts 1969 wurden 25 Patienten mit Pityriasis versicolor untersucht und beprobt. Die Proben konnten erfolgreich in einer Kultur, bestehend aus 3% Malzextrakt, Penicillin, Streptomycin und Aktidion, einem pH von 5,9 und sterilem Olivenöl, welches nach der Inokulation der Proben auf die Oberfläche aufgetragen wurde, angezüchtet werden. Die Kulturen wurden bei 28° oder 30°C inkubiert und nach 7 und 14 Tagen untersucht. Der damaligen Nomenklatur entsprechend waren von den 25 positiven Isolaten 19 reine Kulturen von *Pityrosporum orbiculare* (heute *Malassezia globosa*)

und die anderen 6 bestanden hauptsächlich aus *Pityrosporum orbiculare*, wobei *Pityrosporum ovale* (heute *Malassezia furfur*) auch vorhanden war. In den Kulturen variierten die Zahl der Hefezellen und der Filamente. Faergemann und Bernander (1981) erstellten ein Modell über das Wachstum und die Hyphenbildung von *P. orbiculare* und *P. ovale* auf menschlichem Stratum corneum, auf dem 11%-17,5% der Hefen kurze Filamente von 8-10µm ausbildeten. In einem abgewandelten Milieu mit 7%igem CO₂ bildeten 39%-48% der Pilze Hyphen aus (Faergemann und Bernander, 1981). Pseudohyphen sind auch fast immer in PV-Schuppen vorhanden (Boekhout et al., 2010). Allerdings ist es bei *Malassezia globosa* bis heute noch nicht gelungen, das Hyphenwachstum *in vitro* zu induzieren (Hort und Mayser, 2011; Mayser et al., 2008). Hinsichtlich *Malassezia sympodialis* gibt es in der Literatur kontroverse Meinungen. Einerseits wurde angenommen, dass diese Spezies zur Hyphenbildung fähig ist, andererseits wurde diese Annahme widerlegt (Saadatzaheh et al., 2001b). In der Studie von Saadatzaheh von 2001b wurden verschiedene *Malassezia*-Spezies unter unterschiedlichen Milieubedingungen untersucht. Die Untersuchungen fanden sowohl auf festen als auch in flüssigen Medien statt. Als Untersuchungsmedien wurden die Medien nach Nazarro-Porro (Nazarro-Porro et al., 1977), die Medien von Nazarro-Porro sowie Leeming und Notman (Leeming und Notman, 1987) unter Zugabe von Squalen und Triolein, die Medien von Nazzaro-Porro sowie Leeming und Notman unter Zugabe von Ergosterol und STC (Sodium Taurocholate), das Medium nach Dorn und Roehnert (Dorn und Roehnert, 1977) und ein modifiziertes Hypheninduktionsmedium verwendet. Die Zusammensetzung des Hypheninduktionsmediums ist in Tabelle 2 aufgeführt. Mit diesem Festmedium war es möglich, nach 3-5 Tagen Hyphenbildung bei einigen *Malassezia*-Kulturen aus erkrankten Hautarealen zu induzieren, nicht aber bei Kulturen von gesunder Haut. Es konnte eine Hyphenproduktion von 20-30% induziert werden, in Subkulturen nach 1-2 maligem Umsetzen bis zu 40%. Allerdings war entgegen der Annahme von Guillot und Guého (1995) keiner der *Malassezia-sympodialis*-Stämme in der Lage, Hyphen zu bilden (Saadatzaheh, 2001b). Aktuell nimmt man an, dass in der Kultur keine Hyphen gebildet werden, obwohl kurze Filamente gelegentlich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie beobachtet werden konnten (Boekhout et al., 2010). Die Fähigkeit zur Filamentbildung wird neben *Malassezia furfur* und *Malassezia globosa* auch bei *Malassezia obtusa* für möglich gehalten (Boekhout et al., 2010; Guého et al.,

1996a). *Malassezia obtusa* ist eine seltene *Malassezia*- Spezies (Boekhout, 2010); sie bildet nach 7 Tagen auf modifiziertem Dixon- Agar kleine (4 mm im Durchmesser), glatte und weiche Kolonien mit einer klebrigen Konsistenz. Die Knospung erfolgt auf einer schmalen Basis und auch Filamente können auf diesem Nährboden entstehen. Die Filamente können an jedem Punkt der Oberfläche der Ausgangszelle auftreten (Guého et al., 1996a). Auch in den Untersuchungen von Saadatzadeh (2001a) ist eine Hyphenbildung bei *Malassezia obtusa* beobachtet worden. Für die restlichen *Malassezia*-Spezies *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. sloofiae*, *M. yamatoensis*, *M. caprae*, *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. equina* und *M. cuniculi* wurde keine Hyphenbildung beobachtet, bzw. es ist nichts über eine mögliche Hyphenbildung bekannt (Boekhout et al., 2010).

Tabelle 2: Hypheninduktionsmedium nach Saadatzadeh et al., 2001b

Wirkstoff	Konzentration
Pepton, bakteriell	10 g
Glucose	5 g
Hefeextrakt	0,1 g
Ochsengalle	4 g
Glycerol	1 ml
Glycerol Monostearat	0,5 g
Tween 80	1 ml
Squalen	1 ml
Kalium Nitrat	1 g
Natrium Chlorid	1,3 g
Eisen Sulfat	0,01 g
Glycin	3,75 g
Magnesium Sulfat	0,15 g
Agar	12 g
Cycloheximid	5 ml
Chloramphenicol	4 ml
Ultrahocherhitzte Milch	10 ml
Alle Zutaten in einem Liter destillierten Wassers lösen, pH auf 5,6 einstellen und nach Inokulation des Pilzes bei 30°C inkubieren	

1.3.2 Hyphenbildung in der Kultur

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass sich das Hyphenstadium, bereits beobachtet durch Eichstedt im Jahre 1846 (Eichstedt, 1846), nur sehr schwer unter kulturellen Bedingungen *in vitro* induzieren lässt. Eine Hypheninduktion war *in vitro* zum ersten Mal 1977 möglich, indem die Aminosäure Glycin zum Medium gegeben

wurde (Dorn und Roehnert, 1977). Es wurden 22 Kulturen von *Pityrosporum orbiculare* (heute *Malassezia globosa*) untersucht, die jeweils aus Schuppen erkrankter Hautbezirke isoliert worden waren und weiterhin für 2-8 Monate in Subkulturen im/auf abwechselnd flüssigem und festem Medium angezüchtet wurden. Es wurden für die Untersuchungen nur die Stämme weiterverwendet, die ihre charakteristische Morphologie während des Zeitraumes der *in vitro* Anzüchtung nicht verloren haben. Keiner dieser Stämme entwickelte Hyphen in den Routinemedien. Zur Kontrolle wurden Untersuchungen an *Pityrosporum ovale* (heute *Malassezia furfur*) durchgeführt, die vom CBS bezogen worden waren. In dem Hypheninduktionsmedium wurde Glycin in einer Konzentration von 0.05 Mol hinzugegeben. Neben Glycin bestand das Medium weiterhin aus Ammoniumphosphat Puffer (pH 5.6), Kaliumnitrat, Magnesium- und Eisensulfat, Natriumchlorid, Glukose und Tween 80, deren Variation allerdings nur wenig Einfluss auf die Hyphenbildung hatte. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Medien zeigt Tabelle 3. Nach 7 Tagen Inkubation im Hypheninduktionsmedium wurden die Zellen geerntet und auf ihre Anzahl, ihre Zellmorphologie und ihre Fähigkeit zur Hyphenbildung hin untersucht. Die Morphologie der Hyphenphase war *in vivo* sowie *in vitro* identisch (Dorn und Roehnert, 1977). Kleinere Unterschiede in der Morphologie lassen sich lediglich auf verschiedene Stadien der Hyphenbildung und der Sporulation zurückführen. Deutliche Unterschiede zeigten sich allerdings bei der Größe und der Form der Zellen, die eine ovale oder gar längliche Form aufweisen (Dorn und Roehnert, 1977). Glycin scheint dieser Untersuchung zufolge der wichtigste Faktor zur Induktion der Hyphenbildung zu sein. Variationen im Bereich der anderen Komponenten hatten dagegen nur wenig Einfluss. Im selben Jahr konnte eine Hypheninduktion durch Cholesterol und Cholesterolester bei 20% beider Hefespezies (*Pityrosporum ovale* und *P. orbiculare*) ausgelöst werden (Nazarro-Porro et al., 1977). Hierzu wurden von den Autoren die Stämme 4709 und 4331 von *Pityrosporum orbiculare* aus eigener Kollektion verwendet, die aus Schuppen der Pityriasis versicolor isoliert worden waren und die direkt vom CBS bezogenen *Pityrosporum-ovale*- Stämme 4162 und 5334. Um eine Hyphenbildung bei diesen *Malassezia*-Spezies zu induzieren, wurden Cholesterol, Cholesteryl-Stearat, Cholesteryl-Oleat und Glyceryl-Monostearat jeweils separat, oder in verschiedenen Kombinationen nach Sterilisation zu einem Medium A und B zugegeben. Die Zusammensetzung der

einzelnen Kulturmedien ist Tabelle 4 zu entnehmen. Die Kulturen wurden daraufhin bei 30°C inkubiert und schließlich mit Hilfe einer Nil-Blau-Färbung mikroskopisch auf ihre Zellanzahl, ihre Morphologie und ihre Hyphenbildung untersucht. Eine Mischung aus 0.25% bis 2,0% Cholesterol: Cholesteryl-Stearate: Glyceryl-Monostearate, welches zu Bacto Yeast Morphology Agar und Olivenöl hinzugegeben wurde, führte zu einer Hypheninduktion in Kulturen von *Pityrosporum orbiculare* und *ovale* (Nazarro-Porro et al., 1977). Das Hyphenstadium von *Malassezia furfur* wurde auch in weiteren Studien immer wieder elektronenmikroskopisch untersucht (Barnes et al., 1973; Lee et al., 1989; del Palacio-Hernanz et al., 1990). Weiterhin wurden Untersuchungen an *Pityrosporum ovale* und *P. orbiculare* und *M. pachydermatis* unter aeroben Bedingungen mit 7% CO₂, unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt (Faergemann und Bernander, 1981). Zwei Isolate einer jeden Spezies wurden untersucht. Von *Pityrosporum orbiculare* wurden die Isolate M. 060/78 der eigenen Kollektion und ATCC 42132 der American Type Culture Collection untersucht. Von *Pityrosporum ovale* wurden die Isolate ATCC 1452 und CBS 1878 vom Centraalbureau voor Schimmelcultures und von *M. pachydermatis* wurden der Stamm ATCC 14522 und ein Isolat der eigenen Kollektion für die Untersuchungen verwendet. Die unterschiedlichen *Pityrosporum*-Spezies wurden auf zwei verschiedenen Medien (A und B) untersucht. Medium A bestand aus 10 g/l Neopepton (Dicfo), 18 g/l Bacto Agar (Difco), 40 g/l Glucose, 0,1 g/l Hefeextrakt, 2,5 g/l Glycerol- Monostearat, 2 ml/l Tween 80 und 20 ml/l Olivenöl. Der pH- Wert wurde mit 5 M HCL auf pH 6 eingestellt und nach dem Autoklavieren wurden noch 100 mg/l Chloramphenicol und 50 mg/l Gentamicin hinzugefügt. In diesem Medium konnten alle Spezies gut wachsen. Bei Medium B handelte es sich um ein Hypheninduktionsmedium nach Nazarro-Porro et al. (1977). Die genaue Zusammensetzung dieses Mediums ist in Tabelle 4 dargestellt. Die verschiedenen Spezies wurden nach 4 Tagen Inkubation bei 37°C auf Medium A geerntet, zu 10⁸ Zellen/ml suspendiert und daraufhin in Mengen von je einem ml auf Medium A und Medium B aufgebracht. Anschließend wurden die verschiedenen Spezies unter aeroben Bedingungen, aber erhöhtem Co₂ Zusatz von 7%, unter mikroaeroben Bedingungen in einem Gefäß, gefüllt mit einem Gasgemisch aus 5% O₂, 10% CO₂ und 85% N₂ sowie unter anaeroben Bedingungen in einer Atmosphäre von 90% N₂, 5% H₂ und 5% CO₂ bebrütet. Die Hefen auf Medium A wurden 5 Tage bei 37°C und auf Medium B 11 Tage bei 32°C inkubiert, bevor sie auf ihr Wachstum und ihre

Fähigkeit Hyphen zu produzieren, untersucht wurden. Unter anaeroben Bedingungen waren die Zeiten jeweils 15 und 21 Tage. Makroskopisch gab es bei *P. ovale* und *M. pachydermatis* keine Unterschiede, während *P. orbiculare* deutlich spärlicheres Wachstum zeigte. Weiterhin stellte sich bei den mikroskopischen Untersuchungen heraus, dass die meisten Hyphen unter mikroaeroben Bedingungen gebildet wurden, wenn die Hefen gleichzeitig in dem Medium kultiviert wurden, welches das Hyphenwachstum unterstützt (Medium B), und dass sowohl *P. orbiculare* als auch *Pityrosporum ovale* dieselbe Art von Filamenten produzieren. 1983 wurde von Faergemann et al. (1983a) ein Modell über das Wachstum und die Hyphenbildung von *Pityrosporum orbiculare* und *ovale* auf menschlichem Stratum corneum erstellt. Für diese Untersuchungen wurden die Stämme ATCC 42123, 44031 und 44341 von *Pityrosporum orbiculare* und die Stämme ATCC 1452 und CBS 1878 von *Pityrosporum ovale* verwendet. Wurde der Pilz auf Stratum-corneum-Epithelzellen inkubiert und in PBS (pH 7,2) für 90 min bei 37°C inkubiert, bildeten 11- 17,5% der Hefen kurze Filamente von 8-12µm aus. Wenn die Stratum-corneum-Zellstücke vorher für 5 Tage in einem Milieu mit 7%igem CO₂ inkubiert wurden, so bildeten 39-48% der Pilze Hyphen aus (Faergemann et al., 1983a). Diese Hyphenbildung ähnelte sehr dem mikroskopischen Bild der Tinea versicolor, wobei die längsten Hyphen mit einer Länge von 40- 60µm von *P. ovale* gebildet wurden. Diese Resultate lassen vermuten, dass Feuchtigkeit und das Stratum corneum sehr wichtig für die Hypheninduktion sind, allerdings waren die genauen Umstände zu dieser Zeit immer noch unklar. Ein neues Untersuchungsmodell wurde in diesem Zusammenhang 1989 entwickelt, in dessen Rahmen diesmal *Pityrosporum*-Zellen direkt auf humanem Stratum corneum kultiviert und dann direkt auf ein Kulturmedium gegeben wurden (Faergemann et al., 1989a). Von *Pityrosporum ovale* wurden bei diesen Untersuchungen die Stämme ATCC 44031, 44341, 42132, 44338, 44340, 44344, 1452, CBS 1878 und die zwei Stämme der eigenen Kollektion mit den Nummern 24 und 27 verwendet. Die höchste Rate an gebildeten Hyphen von 24% konnte nach 6 Tagen bei einer Temperatur von 37°C unter mikroaeroben Bedingungen beobachtet werden, und die meisten Hyphen wurden von den Stämmen ATCC 44341 und ATCC 44031 produziert, die mittlerweile beide als *Malassezia sympodialis* klassifiziert sind (Faergemann, 1989b). Unter Zugabe der Aminosäuren Glycin und Serin gelang es in den 1990er Jahren, Hyphen von einer Größe von 20-22x3µm zu induzieren (Mayser

et al., 1998a). Für diese Untersuchungen verwendeten die Autoren *Malassezia furfur* Stämme CBS 1878, 7019, 4162, 4170, 4171, 6000, 6001, 6046 und 6094. Von *Malassezia globosa* wurden die Stämme CBS 7966 und GM 7 und von *Malassezia sympodialis* die Stämme CBS 7222 und 7979 eingesetzt. Des Weiteren wurden die *Malassezia-obtusa*-Stämme CBS 7876 und 7968, die *Malassezia-pachydermatis*-Stämme CBS 1879 und 1892 sowie die *Malassezia-slooffiae*-Stämme CBS 7956 und 7971 untersucht und von *Malassezia restricta* die Stämme CBS 7877 und 7991 für die Untersuchungen herangezogen. Die verschiedenen *Malassezia*-Spezies wurden ebenfalls auf zwei verschiedenen Medien (A und B) getestet. Medium A enthielt alle Inhaltsstoffe, die für eine parenterale menschliche Versorgung nötig sind. 1 l Medium enthielt 600 ml 20% Lipovenös, 300 ml Periplasmal, 5 ml Multibionta, 40 ml Addel und 40 ml Inzolen KM. Aufgefüllt wurde das Medium mit 95 ml doppelt destilliertem Wasser, 0,05 g Chloramphenicol, 0,4 g Cycloheximid und 20 g Agar. Das Medium hatte einen pH von 5,5. Auf diesem Medium war es für alle untersuchten Hefen, außer *Malassezia restricta*, möglich zu wachsen. Das zweite Medium B wurde in dieser Studie benötigt, um den Stickstoff- Stoffwechsel der einzelnen *Malassezia*-Hefen zu untersuchen. Das Medium B hatte ein Endvolumen von 1 l, wurde zu jeweils 10 ml in Petri Schalen mit 10 cm Durchmesser aliquotiert und bestand aus 30 ml Tween 80 ultra, 0,5 g Cycloheximid, 0,05 g Chloramphenicol, 20 g Agar und jeweils 3 g einer unterschiedlichen Stickstoffquelle. Das ganze Medium wurde mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt, autoklaviert und mit 0,1 N HCL auf einen pH von 5,5 eingestellt. Außer *Malassezia restricta* wuchsen alle getesteten Spezies auf Medium A. Das beste Wachstum zeigte hierbei *Malassezia furfur*. Vor allem *Malassezia furfur* CBS 7019 bildete Hyphen unter Glycin- und Serin-Zugabe in Medium B aus. Saadatzahe führte 2001 Untersuchungen durch, in denen er 33 verschiedene *Malassezia*-Stämme auf unterschiedlichen Kulturmedien, unter anderem auf bereits bekannten Medien, anzüchtete und die Fähigkeiten der einzelnen Hefestämme zur Hyphenbildung beobachtete. Ungeachtet der bisherigen Kenntnisse zur Hyphenbildung bei *Malassezia*-Hefen ist bis heute nach wie vor nur sehr wenig über das eigentliche Stadium der Hyphenbildung bekannt. Die Dichte der Hyphen beträgt *in vivo* bis zu 100% in Bereichen, die mit PV befallen sind, 42% in nicht befallenen Arealen im Bereich des Stammes und 50% treten in befallenen Bereichen des Kopfes auf. In 6-7% der Fälle wurde das Hyphenwachstum allerdings auch auf gesunder Haut beobachtet (McGinley et al., 1975). Demzufolge wird angenommen, dass die

Hyphenbildung offenbar eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Pityriasis versicolor spielt, da immer reichlich Hyphen in Schuppen aus Läsionen nachweisbar sind (Gordon 1951a, 1951b). *Malassezia globosa* gilt zwar mittlerweile als eigentlicher Auslöser der PV in gemäßigten Klimazonen (Aspiroz et al., 2002; Crespo Erchiga et al., 2000; Dutta et al., 2002; Gaitanis et al., 2006; Hernández et al., 2003; Karakaş et al., 2009; Morishita und Sei, 2006; Nakabayashi et al., 2000; Prohic und Ozegovic, 2007; Salah et al., 2005; Shokohi et al., 2004), allerdings ist es bei dieser Spezies bisher nur mäßig gelungen, eine Hyphenbildung *in vitro* zu induzieren.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Kulturmedien (Dorn und Roehnert, 1977)

<u>Festmedium für Routinekultivierung und Erhaltung der Stämme</u>	
Wirkstoff	Konzentration
Olivenöl	2 %
Tween 80	0,2 %
Hefeextrakt (Difco)	0,1 %
Glucose	2 %
Bacto Agar (Difco)	1,5 %
Chloramphenicol	50 mg/l
Cycloheximid	500 mg/l
pH-Einstellung auf 5,6 mit HCL und autoclaviert	
<u>Flüssigmedium für die Erhaltung der Subkulturen</u>	
Wirkstoff	Konzentration
Tween 80	7,5 %
Hefeextrakt (Difco)	0,25 %
Getrocknete Czapek-Dox Bouillon (Difco)	3,5 %
Chloramphenicol	50 mg/l
Cycloheximid	500 mg/l
pH-Einstellung auf 5,6 und autoklaviert	

Fortsetzung von Tabelle 3 von Seite 20	
Hypheninduktionsmedium	
Wirkstoff	Konzentration
Ammoniumphosphatpuffer, pH 5,6	0,06 M
Kaliumnitrat	1,0 gm
Magnesiumsulfat	0,13 gm
Eisensulfat	0,007 gm
Natriumchlorid	1,3 gm
Glucose	13 gm
Tween 80	50 ml
Chloramphenicol	0,05 gm
Cycloheximid	0,5 gm
Destilliertes Wasser	1 l
Nach Auffüllen mit destilliertem Wasser autoklavieren	
Danach Zugabe von Glycin, gelöst in destilliertem Wasser und sterilfiltriert	0,05 M
Für festes Medium Zugabe von 4% Tween 80 und 2 % Bacto Agar (Difco)	

Tabelle 4: Kulturmedien nach Nazzaro-Porro et al., 1977	
Medium A: Isolation von P. orbiculare aus Hautschuppen	
Destilliertes Wasser	1 l
Hefeextrakt (Difco)	10 gm
Agar	20 gm
Olivenöl	200 ml
Sterilisation bei 121°C für 15 min, danach pH auf 6,8 einstellen	
Medium B: Medium für Kultivierung, Erhalt der Zellen und für Versuche	
Bacto Yeast Morphology Agar	(Wickerham 1951)
Ölsäure	4 %
Sterilisation bei 121°C für 15 min, danach pH auf 4,8 einstellen	

2 Hintergrund und Fragestellung

Die Pityriasis versicolor ist eine der häufigsten oberflächlichen Hautpilzerkrankungen weltweit, deren Pathogenese bis heute noch nicht eindeutig geklärt ist. Die *Malassezia*-Hefen gelten als Erreger dieser Erkrankung, allerdings sind diese Hefen molekularbiologisch wenig untersucht. Charakteristisch für diese Erkrankung ist das typische mikroskopische Bild der „Spaghetti und Fleischklößchen“, also der Hefezellen und deren ausgebildeten Hyphen in Schuppenmaterial der betroffenen Hautbezirke. Aufgrund der Tatsache, dass die Hyphen auf erkrankter Haut deutlich häufiger vorkommen als auf gesunder Haut, spricht man ihnen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Pityriasis versicolor zu und sieht sie in diesem Zusammenhang als möglichen Pathogenitätsfaktor.

Da über die Hyphenbildung der *Malassezia*-Hefen nur sehr wenig bekannt ist und der Zusammenhang hinsichtlich der Pathogenese der Pityriasis versicolor bis heute noch nicht geklärt werden konnte, ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Unter welchen *in vitro* Bedingungen können bei *Malassezia*-Hefen Hyphen induziert werden?
2. Welche der *Malassezia*-Spezies sind zur Hyphenbildung fähig?
3. Das Genom von *Malassezia furfur* ist bislang nicht bekannt - Lassen sich dennoch Gensequenzen identifizieren, die für die Hyphenbildung verantwortlich sind?
4. Mit welchen molekularbiologischen Methoden können mögliche Gensequenzen identifiziert werden?
5. Können diese Sequenzen durch Abgleich mit anderen Datenbanken der Hyphenbildung zugeordnet werden?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Agar, 1b (Minimalnährmedium), 100ml

20 g Agar

0,1 g KH_2PO_4

0,05 g MgSO_4

3 ml Tween 80

0,15 mM der jeweiligen Aminosäure Arginin, Alanin oder Glycin
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C

2 ml (0,0125 g) Chloramphenicol Stammlösung

Agar, Modifizierter (m)Dixon, 100ml (Guého et al., 1996a)

3,6 g Malzextrakt

2 g Ochsen-galle

1,2 g Agar Agar

0,6 g Pepton (aus Casein)

0,04 g Cycloheximid

1 ml Tween 40

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C

0,8 ml (5 mg) Chloramphenicol-Stammlösung

400 µl Olivenöl

Agarosegel für RNA, 1%, denaturierend

0,3 g Agarose

23 ml Aqua dest.

nach Aufkochen in der Mikrowelle und Abkühlen auf ca. 60°C

3 ml 10 x Mops (siehe Seite 41)

5 ml 37% Formaldehyd

Ammoniumacetat-Lösung, 4 M

30,8 g Ammoniumacetat

mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen

Ampicillin Stammlösung, 1 ml

50 mg Ampicillin-Natriumsalz
in 1ml Aqua dest. lösen und steril filtrieren
Lagerung bei -20°C

Antikörper-Lösung 1:10, 20 ml

2 µl Anti-DIG-Antikörper
20 ml 1 x Blocking Solution (immer frisch angesetzt)

Apotheke des Universitätsklinikums

Olivenöl, steril

AppliChem GmbH, Darmstadt, D

Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)

Blocking-Lösung 1x, 100 ml

10 ml 10x Blocking Solution
90 ml Maleinsäurepuffer

Blocking-Lösung 10x, 100 ml

10 g Blocking Pulver
mit Maleinsäurepuffer auf 100 ml auffüllen
auf Heizblock lösen, dann autoklavieren

B. Braun, Melsungen, D

Aqua dest.
0,9 % NaCl-Lösung

Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F

Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit
10x PCR Puffer
50x BD Advantage cDNA Polymerase

Clontech: Sequenzen und Primer, Primersequenzen (5'> 3')**cDNA-Synthese Primer:**

TTTTGTACAAGCTT30N-1N

Adapter1:

CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCA
GGTGGCCCGTCCA

Adapter 2R:

CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGG
TCCGGCTCCA

PCR-Primer 1:

CTAATACGACTCACTATAGGGC

(komplementär zum 5'-Bereich von Adapter 1 und Adapter 2R)

***Nested* PCR-Primer 1:**

TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT

(komplementär zum 3'-Bereich von Adapter 1)

***Nested* PCR-Primer 2R:**

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

(komplementär zum 3'-Bereich von Adapter 2R)

M 13 Primer forward (Kolonie PCR):

5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

M 13 Primer reverse: (Kolonie PCR):

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Chloramphenicol-Stammlösung, 50 ml

312,5 mg Chloramphenicol

in 50 ml Aqua dest. lösen und steril filtrieren

Denaturierungslösung, 1 l

20 g 0,5 M NaOH

87,66 g 1,5 M NaCl

mit Aqua dest. auf 1l auffüllen

Detection Buffer, 1 l

15,76 g 0,1 M Tris-HCL

5,84 g 0,1 M NaCl

mit Aqua dest. auf 700 ml auffüllen und mit NaOH-Plätzchen pH auf 9,5 einstellen

mit Aqua dest. auf 1l auffüllen

DNase-Reaktions-Mix, 260 µl

235 µl Reaktions-Puffer für DNase (MN)

25 µl rDNase(MN)

zu 250 µl auf das Zentrum der Säule auftragen

DNase-Verdau-Mix, 50 µl

5 µl DNase Puffer 10 x
2 µl DNase
0,5 µl RiboLock RNase-Inhibitor
Aqua dest. bis 30 µl auffüllen

EDTA 0,5M, 100 ml

18,6 g EDTA
pH auf 8,0 einstellen
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

Eppendorf, Hamburg, D

Thermomixer Comfort
Pipettenspitzen, 10,100, 1000 µl
Plastik Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml

Fermentas, St. Leon-Rot, D

RiboLock RNase-Inhibitor
6x Loading Dye
6 x DNA Loading Dye

Flüssigmedium, 1b (Minimalnährmedium), 100 ml

0,1 g KH_2PO_4
0,05 g MgSO_4
3 ml Tween 80
15 mM der jeweiligen Aminosäure
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C
2 ml Chloramphenicol-Stammlösung

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Cellstar Polypropylenröhrchen, 15 ml, 50 ml
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml
200 µl PCR-Plastic-Tubes

High Stringency Buffer, 500 ml

2,5 ml 20x SSC (siehe Seite 44)
2,5 ml 20% SDS
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Invitrogen, Paisley, U.K.

10 x PCR-Puffer
Dynabeads mRNA-Purification Kit
DynaMag Spin Magnet
MgCl₂ (50 mM)
M13 Primer forward und reverse (10 mM)
One Shot TO 10 chemically competent *E.coli*
PCR 2.1 TOPO TA Cloning Vektor
PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit
Taq-Polymerase (0,5 U)
TOPO TA Cloning Kit

Karl Beese, Barsbüttel, D

sterile Wattestäbchen

LB-Amp-Agar, 100 ml

(Ampicillin Konzentration: 50 µg/ml)
4 g LB-Agar
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C
100 µl Ampicillin Stammlösung

LB-Flüssigmedium (LB-Amp-Broth), 100 ml

2,5 g LB-Broth
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C
100 µl Ampicillin-Stammlösung

Low Stringency Buffer, 500 ml

50 ml 20x SSC
2,5 ml 30% SDS
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Lysis-Solution (DNA), 100 ml

2 ml Triton X-100
5 ml 20% SDS
2 ml 5M NaCl
1 ml 1M Tris, pH 8
200 µl 0,5M EDTA
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

(für RNA-Lysis-Solution gilt: Alles außer Tris zusammengeben, 100 µl DEPC hinzugeben, über Nacht rühren, autoklavieren, Tris dazu, noch einmal autoklavieren)

Macherey und Nagel, Düren, D

NucleoSpin RNA-L Purification Kit
NucleoSpin RNA clean-up

Maleic Acid Buffer, 1 l

11,6 g 0,1M Maleinsäure
8,766 g 0,15M NaCl
mit Aqua dest. auf 700 ml auffüllen und pH mit NaOH Plätzchen auf 7,5 einstellen
mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Melitta Toppits, Minden, D

Frischhaltefolie

Merck, Darmstadt, D

Agar, reinst
Chloramphenicol
Chloroform
Cycloheximid
Isopropanol (2-Propanol), reinst
 KH_2PO_4
Malzextrakt
 MgSO_4
Natriumhydroxid-Plättchen
Ochsengalle, getrocknet, rein
Natronlauge (NaOH) 1 mol/l
Pepton

Mops 10x

10 mM EDTA
50 mM Natriumacetat
200 mM MOPS (pH 7)

NaCl 5M, 100 ml

29,2 g NaCl
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

Neutralisierungslösung, 1 l

157,6 g 1M Tris-HCL
87,66 g 1,5M NaCl
mit Aqua dest. auf 700 ml auffüllen und den pH mit NaOH auf 7,4 einstellen
mit Aqua dest. auf 1l auffüllen

Nunc, Roskilde, Dänemark

Agarplatten
Cryo Tube Vials

Peqlab, Erlangen, D

Agarose

PeqGold RNAPure

Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl

Promega, Mannheim, D

dNTPs (10 mM) für Kolonie PCR

Poly-A-Tract mRNA-Isolation System III und IV

Proteinase K-Stammlösung, 5 ml

100 mg Proteinase K

in 5 ml Aqua dest. lösen

Riedel-de Haën , Seelze, D

Ethanol 100%

Roche Diagnostics, Mannheim, D

Anti-Digoxigenin-Antikörper

Blocking Pulver

Chemielumineszenz-Lösung

10 x DNase Puffer

DIG Easy Hyb

DNA Molecular Weight Marker VI, Digoxigenin-labeled

DNase

Dig Molecular Weight Marker VI, Digoxigenin-labeled

Glycogen for mol. biol.

Lumifilm

Nylonmembran (Hybond™-N+)

PCR DIG Probe Synthesis Kit

Roth, Karlsruhe, D

Ammoniumacetat
Ampicillin-Natriumsalz
DEPC
Ethanol 70%, 96% und 100%
Ethidiumbromid
Formaldehyd 37%
H₂O, Rotipuran Low Organic Purity
LB-Agar
LB-Broth
autoklavierbare Entsorgungsbeutel
Maleinsäure
NaCl
NaCitrat
Natronlauge (NaOH) 4 mol/l
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, 25:24:1
Proteinase K
Roti-Load RNA Ladepuffer
20% SDS
Tris
Tris-hydrochlorid

Schott AG, Mainz, D

Gewindeflaschen Duran 500 ml, 1 l und 2 l
Hybridisierungsflaschen/Rollerflaschen

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Alanin
Arginin
EDTA
Glassbeads, acid washed
Glycin
2-Mercaptoethanol
Triton x-100
Tween 20
Tween 40
Tween 80

SSC 20x, 1 l

88,23 g 0,3M NaCitrat
175 g 3M NaCl
mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

Stripping Solution, 500 ml

100 ml 1M NaOH
2,5 ml 20% SDS
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

TAE Puffer 50x, 1 l

242 g Tris Base
57,1 ml Eisessig
37,2 g EDTA
mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

(Für 1x TAE Puffer 50x Stammlösung 1:49 mit sterilem Aqua dest. verdünnen)

TE-Puffer 10x, 500 ml

78,8 g 1M Tris-HCL
18,6 g 0,01M EDTA
pH mit NaOH auf 7,5-8 einstellen
mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Tork, Mannheim, D

Papiertücher

Tris, 1M, pH 8,0, 200 ml

31,52 g Tris-HCL

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen

Washing Buffer, 100 ml

99,7 ml Maleinsäure Puffer

3 ml Tween 20

Whatman GmbH, Dassel, D

3MM Chromatographiepapier

3.2 Geräte

AGFA, Belgien, D

Curix 60 Entwicklungsautomat

Biometra (BDA) Digital, D

UV- Transluminator

Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, D

Kühl- und Gefrierschrank

Cleanair, Minneapolis, USA

Laminar-flow, Typ DLF-REL 6

Eppendorf, Hamburg, D

BioPhotometer plus

Centrifuge 5415 D

Mastercycler gradient

Thermomixer comfort

UVette 50-2000 µl

GFL, Burgwedel, D

Hybridisierungssofen 7601

Heraeus, Hanau, D

Brutschrank

Gefrierschrank -70°C

Heraeus Biofuge Primo R Centrifuge

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

Rotina 38

IKAMAG, IKA-Labortechnik, Staufen i. Br., D

Magnetrührer

Köttermann, Uetze/Hänigsen, D

Laminarflow/ Sicherheitswerkbank 8511

Abzug

Leitz, Wetzlar, D

Dia-Lux Mikroskop

Melag, Berlin, D

Melag Autoclave Typ 23

Memmert, Schwabach, D

Sterilisator

Trockenschrank

Wasserbad

New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison N.J. USA

G 24 Environmental Incubator Shaker

Sartorius Research, Göttingen, D

Halbmikrowaage Modell R 180 D

Superior-Mariendorf, Lauda Königshofen, D

Neubauer Zählkammer

Peqlab Biotechnologie GmbH, D

Gelkammer 40-1214

Gelschlitten

Scientific Industries, Inc.

Vortex Genie 2

Thermo Dux, Heidelberg, D

Techne Dri Block, Modell DB-3

Whatman Biometra, D

PS 305 T

3.3 Methoden

3.3.1 Verwendete Referenzstämme

Als Grundlage aller Untersuchungen diente die Spezies *Malassezia furfur* CBS 7019, die vom Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands, käuflich erworben wurde. Bei den Hypheninduktionsversuchen, sowohl auf festem als auch in flüssigem Medium, wurden des Weiteren die Stämme *Malassezia globosa* CBS 7966, *Malassezia pachydermatis* 1892, *Malassezia obtusa* 7968, *Malassezia sympodialis* 7979 und *Malassezia sloofiae* 12 verwendet. Diese Spezies stammen aus der labor-eigenen Sammlung. Die verschiedenen *Malassezia*-Spezies wurden jeweils vor Beginn der Versuche mittels DNA-Abgleich auf ihre Reinheit überprüft.

3.3.2 Anzucht und Kultivierung von *Malassezia*-Hefen

3.3.2.1 Feste Nährmedien

3.3.2.1.1 Anzucht und Kultivierung

Die *Malassezia*-Hefen wurden auf modifiziertem Dixon-Agar angezüchtet (Guého et al., 1996a). Dafür wurde etwas Pilzmaterial mit einem sterilen Wattestäbchen von einer Plattenkultur bzw. aus in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Kulturen unter einer Laminar-air-flow-Arbeitsbank entnommen und gleichmäßig auf eine frische Agarplatte ausgestrichen. Cycloheximid und Chloramphenicol dient hierbei zur Unterdrückung anderer Pilze bzw. von Bakterien. Nach vier Tagen war das Wachstum ausreichend für die weiteren Versuche. Nach sieben Tagen wurden die Kulturen regelmäßig auf frische Nährmedien übertragen, um deren Reinheit und Lebenserhaltung zu garantieren. Dieser Agar wurde selbst im Labor hergestellt. Ein Teil der kultivierten Pilze wurde nach einiger Zeit wiederholt kryokonserviert, damit stets ausreichend Pilz-Substanz für spätere Arbeiten vorhanden war. Hierzu wurden die Pilze mit einem sterilen Wattestäbchen in ein steriles Kunststoffröhrchen (Cryo Tube Vials, Nunc, Roskilde, Denmark) gefüllt und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

3.3.2.1.2 Induktion der Hyphenbildung auf festem Medium

Für die eigentlichen Hypheninduktionsversuche wurde ein weiterer Nährboden verwendet: modifizierter 1b-Agar. Nach 4-tägiger Kultivierung der *Malassezia*-Hefen auf modifiziertem Dixon-Agar wurden sie zur Hypheninduktion auf den modifizierten 1b-Agar übertragen. Dieser Agar diente bereits Mayser et al. (1998b) bei der Entdeckung der indolhaltigen Pigmente vorzüglich *Malassezia furfur* als Nährboden. 1b-Agar ist ein transparenter Minimalagar, der um Vitamine, Spurenelemente, Elektrolyte und Kohlenhydrate reduziert wurde und nur noch aus einer Lipidquelle und einer Stickstoffquelle besteht. Als Stickstoffquelle, die nachweislich in der Literatur neben Serin eine Hypheninduktion *in vitro* auslösen kann, wurde die Aminosäure Glycin verwendet. Diese ist wiederum ein Abbauprodukt von Serin. Als Negativkontrolle diente ein 1b-Minimalnährmedium unter Zusatz der Aminosäure Alanin als einziger Stickstoffquelle, die nachweislich nicht zu einer Hypheninduktion führt. Des Weiteren wurde dem Agar die Lipidquelle Tween 80 zugeführt. Die Verwendung von Tween war essentiell für das Wachstum der Pilze. Der modifizierte 1b-Agar wurde selbst im Labor hergestellt.

3.3.2.2 Flüssige Nährmedien

3.3.2.2.1 Anzucht und Kultivierung

Zunächst wurden 12 Platten des modifizierten Dixon-Agars mit 4-5 Tage bei Raumtemperatur bebrüteten *Malassezia*-Kulturen mit einem sterilen Metallspatel geerntet und in 20 ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen (3.500 rpm für 5min.). Daraufhin wurde das gewaschene Pilzpellet in 10 ml eines 1b-Arginin-Flüssignährmediums suspendiert und in ein 400 ml 1b-Arginin-Flüssignährmedium überführt. Dieses 1b-Flüssignährmedium ist genauso zusammengesetzt wie 1b-Agar, nur dass der Zusatz der Substanz Agar-Agar entfällt. Es setzt sich zusammen aus Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Tween 80 und der Aminosäure Arginin. Diese Flüssigkultur wurde 4 Tage bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer inkubiert. Nach 4 Tagen konnten diese Kulturen für weitere Versuche verwendet werden.

3.3.2.2.2 Induktion der Hyphenbildung in flüssigem Medium

Jeweils 200 ml Pilzkultur aus dem 1b-Arginin-Flüssignährmedium wurden gewaschen und in 400 ml 1b-Glycin-Hypheninduktionsmedium bzw. in das 1b-Alanin-Kontrollmedium überführt. Diese Flüssignährmedien wurden dann für 6 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer inkubiert. Nach 6 h wurde das Flüssigmedium zu jeweils 50 ml in 50 ml Falcon Tubes überführt und für 5 min bei 3500 rpm abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das überschüssige Medium abgeschüttet und die entstandenen Pilzpellets in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

3.3.2.2.3 Induktion der Hyphenbildung unter Zusatz von CO₂

Je 400 ml Pilzkultur, suspendiert in 1b-Glycin-Flüssignährmedium, wurden 7 Tage im Inkubationsschrank bei einer Temperatur von 37°C und unter erhöhter CO₂ - Spannung von 5% inkubiert. Eine 1b-Glycin-Flüssigkultur wurde dabei auf einem Magnetrührer inkubiert, die andere 1b-Glycin-Flüssigkultur wurde ohne Magnetrührer in den Inkubationsschrank gestellt. Als Negativkontrollen dienten auch hier 1b-Alanin-Flüssignährmedien, die unter den gleichen Bedingungen wie die Hypheninduktionsmedien sowohl mit als auch ohne Magnetrührer inkubiert wurden. Die Deckel der Probenflaschen wurden hierbei nicht komplett verschlossen, so dass das CO₂ gut in die Flaschen gelangen konnte. Als Kontrollen dienten 1b-Glycin-, bzw. 1b-Alanin-Flüssignährmedien, denen kein Pilz zugesetzt wurde. Hierdurch konnten Kontaminationen ausgeschlossen werden.

3.3.2.2.4 Induktion der Hyphenbildung unter anaeroben Bedingungen

400 ml einer 1b-Glycin-Flüssigkultur wurden in eine 2 l Schott-Flasche überführt. Der Deckel wurde komplett verschlossen und die Kultur 7 Tage auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den kompletten Verschluss des Deckels der Schott Flasche war es nicht möglich, dass O₂ in die Flasche eindringen konnte, wodurch anaerobe Bedingungen geschaffen wurden. Die Luftsäule die sich vorher in der Flasche befand wurde vor der Bebrütung abgesaugt. Als Negativprobe diente auch hier eine 1b-Alanin- Flüssigkultur, die unter den gleichen Bedingungen wie die 1b-Glycin-Flüssigkultur inkubiert wurde. Als Kontrolle diente eine 1b-Flüssigkultur ohne Zusatz von Pilzkultur, um auch hier Kontaminationen auszuschließen.

3.3.2.2.5 Induktion der Hyphenbildung in Abhängigkeit des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses

Dieser Versuch diene zur Etablierung des eigentlichen Hypheninduktionsversuchs. Es wurden jeweils ein festgesetztes Volumen von 400 ml der 1b-Flüssigpilzkultur unter Zusatz der Aminosäuren Glycin bzw. Alanin als alleiniger Stickstoffquelle hergestellt und in unterschiedlich große Gefäße überführt. Als Gefäße dienten Erlenmeyerkolben und Bechergläser aus Glas unterschiedlicher Größe mit einem Fassungsvermögen von je 50 oder 250 ml. Zusätzlich wurden jeweils 400 ml des 1b-Flüssigmediums in Schott-Glasflaschen mit einem maximalen Fassungsvermögen von 500 ml, 1 l und 2 l überführt. Die Flüssigkulturen in den verschieden großen Gefäßen wurden daraufhin 7 Tage bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer inkubiert. Die Pilzzellen und das Hyphenwachstum wurden sodann nach jeweils einer Stunde sowie nach 2, 3, 4, 6, 12, 24, 26, 29, 30, 32, 48, 51 und 72 Stunden unter dem Mikroskop beobachtet und die Hyphen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer in einer Verdünnung 1:10 zu jedem der angegebenen Zeitpunkte ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anzahl der Hyphen aus den 5 Kleinquadraten der Neubauer-Zählkammer wurden daraufhin mit Hilfe folgender Formel in die Anzahl der Hyphen pro ml Flüssigmedium umgerechnet:

$$\frac{\text{ausgezählte Zahl} \times 10}{0,2 \times 0,1 \times 1} = \text{Anzahl Hyphen pro ml Flüssigmedium}$$

Des Weiteren wurde die Oberfläche des Flüssigmediums zur Luft in den verschieden großen Schott-Glasflaschen berechnet und mit dem Flüssigkeitsvolumen (immer 400 ml) ins Verhältnis gesetzt:

Oberfläche des Flüssigmediums zur Luft: $A = \pi \times r^2$

3.3.2.3 Aufbereitung von *Malassezia furfur* aus der Flüssigkultur und Kryokonservierung

Da bei keiner der anderen untersuchten *Malassezia*-Spezies eine Hyphenbildung induziert werden konnte, wurde nur *Malassezia furfur* kryokonserviert. Nach 6-stündiger Inkubation der 1b-Glycin-Hypheninduktionskulturen bzw. der 1b-Alanin-Negativkontrollkulturen wurden die 400 ml-Kulturen jeweils in 50 ml Falcon Röhrchen abgefüllt, bei 3500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen in 10 ml 0,9% NaCl wurden die Pilzpellets erneut 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abermals verworfen und die Falcon Röhrchen mit den so gewonnenen Pilzpellets bei -196 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3 DNA- und RNA-Isolierung

3.3.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Malassezia*-Hefen

3.3.3.1.1 Phenol-Chloroform-Methode

Zunächst wurde eine Spatelspitze Pilzmaterial mit einem sterilen Metallspatel von einer 4 Tage alten mDixon-Dauerkultur entnommen und mit 1,5 ml sterilem Aqua dest. in einem 2 ml sterilem Plastikröhrchen unter Vortexen suspendiert und daraufhin für 2 min bei 13.000 rpm (2082xg) abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl sterilem Aqua dest. gelöst und für 5 sek bei 13.000 rpm (2082xg) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im restlichen H₂O resuspendiert. Daraufhin wurden 200 µl Lysis-Solution für DNA und ca. 300 µg in Salzsäure gereinigte Glasskügeln hinzugefügt und mittels Vortexen durchmischt. Die Lysis-Solution und die Glasskugeln sollen in diesem Schritt die sehr dicke und widerstandsfähige Zellwand der *Malassezia*-Hefen aufbrechen. Nach Zugabe von 200µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol unter dem Abzug wurde die Lösung für 30 min suspendiert und 200 µl TE-Puffer hinzugegeben. Daraufhin folgte eine erneute Zentrifugation der Probe für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und die Überführung der oberen Phase in ein neues 1,5 ml Röhrchen. Hierbei war besonders wichtig, die Zwischenphase der beiden Flüssigkeitsphasen nicht zu berühren. Nach Zugabe von 1 ml 100% Ethanol zur oberen Phase wurde das Plastikröhrchen mit der

Hand vorsichtig geschwenkt und die enthaltene DNA daraufhin für eine Stunde bei -20°C gefällt. Danach wurde die Probe 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl TE gelöst. Hieran schloß sich die Zugabe von 3 µl RNase A an, und alles wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde die Probe gelegentlich per Hand geschwenkt, damit sich das Pellet vollständig löste. Der Probe wurden daraufhin 10 µl einer 4 M Ammoniumacetat-Lösung und 1 ml 100% Ethanol hinzugegeben, alles kurz geschwenkt und bei -20°C für mindestens 30 min präzipitiert. Eine Lagerung der Probe bei -20° über Nacht war ebenfalls möglich. Die Probe wurde danach 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet für weitere 5 min bei Raumtemperatur in 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet für ca. 5 min luftgetrocknet, in 30µl Aqua dest aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.3.3.2 Isolierung von Gesamt- RNA aus *Malassezia furfur*

Zu *Malassezia furfur* sind bis heute kaum molekularbiologische Methoden für weitere Analysen bekannt. Zudem ist die Hefe bislang nur wenig molekularbiologisch untersucht worden. Daher wurden verschiedene Protokolle zur Gesamt-RNA-Isolierung ausgetestet, um zu sehen, welche Methode für unsere Ansprüche und für die Organismus-spezifischen Besonderheiten die am besten geeignete war. Um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu verhindern, wurden alle Arbeitsflächen, Pipetten und Geräte regelmäßig mit Alkohol gereinigt und mit RNase AWAY abgewischt. Es mussten immer Handschuhe getragen werden, und auch diese wurden regelmäßig mit Alkohol und RNase AWAY besprüht und eingerieben. Zudem wurden die Handschuhe regelmäßig gewechselt. Es wurden RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter verwendet und die Verbrauchsmaterialien mussten in jedem Fall die Angabe „RNase frei“ tragen. Auch angesetzte Puffer, Lösungen und das Aqua dest. wurden mit DEPC behandelt. Um einer Degradierung der RNA entgegenzuwirken, wurden die Proben zwischen den einzelnen Arbeitsschritten immer auf Eis gestellt und nur bei 4°C zentrifugiert.

Folgende Protokolle wurden geprüft:

1. Laborprotokoll von Frau Dr. Lang
2. Macherey-Nagel Herstellerprotokoll
3. Abgewandeltes PeqGold RNAPure Herstellerprotokoll
(für *M. furfur* optimiert)

3.3.3.2.1 Laboreigenes optimiertes Protokoll von Frau Dr. Lang

Entweder wurden bereits abzentrifugierte und bei -80°C gelagerte Pilzpellets verwendet, oder sie wurden frisch aus 50 ml Flüssigkultur gewonnen, indem sie in einem 50 ml Cellstar-Polypropylenröhrchen für 5 min bei 3500xg abzentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde. Die Pilzpellets wurden in 750 µl Lysis-Solution und 40 µl Proteinase K-Stammlösung suspendiert bzw. aufgetaut. Das Ganze wurde dann durchmischt und in jeweils vier 2 ml Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt. Durch Schütteln für 15 min bei 65°C mittels Thermomixer wurde die Zellwandlyse eingeleitet und schließlich gestoppt, indem die Proben auf Eis gestellt wurden. Den Proben wurde je 1 ml PeqGold RNAPure zugefügt, und sie wurden daraufhin für 15 Sekunden mittels Vortexer durchmischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann mit 300 µl Chloroform versetzt, durchmischt und 15 min bei 12.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die obere Phase (ca. 800 µl) wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und 800 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugefügt. Die Proben wurden kurz, aber gründlich „gevortext“, so dass die zwei Phasen gut durchmischt wurden und bei 12.000 rpm für 10 Minuten und bei 4°C zentrifugiert. Erneut wurde danach die obere Phase (ca. 600 µl) in ein neues Tube überführt und mit 480 µl 0,8% Vol. Isopropanol gefällt. Da nur geringe Mengen RNA zu erwarten waren, wurde den Proben 3,5 µl Glycogen (70U pro ml PeqGold RNAPure) hinzugegeben. Das Ganze wurde daraufhin vorsichtig geschwenkt und 10 Minuten bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml Ethanol (-20°C), dem 0,05% DEPC zugefügt wurden, dazupipettiert. Die Proben wurden 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurden sie in 20 µl Aqua dest. aufgenommen.

3.3.3.2.2 DNase-Verdau und Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA

Die in 20 µl Aqua dest. aufgenommene RNA wurde zu 30 µl mit DNase-Verdau-Mix versetzt und das Ganze für 30 min bei 37°C im Thermoblock unter leichtem Schütteln inkubiert. Es wurden daraufhin 47,5 µl Aqua dest. und 2,5 µl (50 µg) Proteinase K zum DNase-Verdau hinzupipettiert und 20 min bei 55°C weiter unter Schütteln inkubiert. Durch diesen Schritt wurde der Verdau schließlich gestoppt. Danach wurden die Proben mit 400 µl Aqua dest. und 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, mit 0,8% Isopropanol präzipitiert und zweimal mit 1 ml 70% Ethanol, der vorher mit 0,05% DEPC versetzt wurde, gewaschen und das Pellet schließlich an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 µl Aqua dest. gelöst und die Eluate derselben Kultur jeweils zusammengefasst. Alle RNA-Proben wurden bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3.2.3 Zellwandlyse und Herstellerprotokoll von Macherey-Nagel

Da die Zellwand von *Malassezia*-Hefen sehr widerstandsfähig und dick ist, musste die Zellwand erst durch ein anderes Verfahren aufgebrochen werden, bevor mit dem eigentlichen Protokoll von MN begonnen werden konnte. Dieses war besonders wichtig, um eine höhere RNA-Ausbeute erzielen zu können. Zur Vorbehandlung wurden dem Pilzpellet aus 50 ml Flüssigkultur 2 ml Lysis-Solution (für RNA) zugefügt. Das Ganze wurde kurz „gevortext“ und bei Raumtemperatur für 30 min. stehen gelassen. Die entstandene Suspension wurde daraufhin nochmal kurz gevortext und dann bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml sterilem und DEPC behandeltem Aqua dest. gewaschen. Dem gewaschenen Pellet wurden 3,6 ml RA1-Puffer und 36 µl Beta-Mercaptoethanol hinzugefügt, die Probe dann gevortext, und die entstandene Suspension wurde auf zwei 15 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Die Zellsuspension wurde zur besseren Zellwandlyse jeweils dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in lauwarmem Wasser aufgetaut. Daraufhin wurde das Ganze auf zwei Nucleo-Spin-Filter L Säulen aufgetragen und für 10 min bei 4.500xg und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt verbesserte die Homogenisierung der Probe und entfernte nicht lösliches Material, das auf der Säule verblieb. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Probe wurde mit 3,6 ml 70% Ethanol präzipitiert und alles dreimal für jeweils 5 Sekunden „gevortext“. Die Probe wurde daraufhin auf eine

Nucleo-Spin-RNA L Säule aufgetragen und für 3 min bei 4500xg und 4°C zentrifugiert. Der Säule wurden 2,2 ml Membrane-Desalting-Buffer zugegeben und alles bei 4500xg für 3 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 250 µl DNase-Reaktions-Mix (s.o) auf die Säule aufgetragen. Der Verdau wurde für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Es schlossen sich drei Waschschrte an, bei denen die Probe erst mit RA2-Puffer und in den beiden anschließenden Waschschrten mit RA3-Puffer gewaschen wurde. Der Durchfluss wurde zwischen den einzelnen Schritten verworfen. Schließlich wurde die RNA mit 500 µl RNase-freiem Wasser für 2 min eluiert und durch Zentrifugation der Säule bei 4500xg für 3 min in einem sterilen und RNase-freiem Zentrifugenröhrchen (Collection Tube-MN) aufgefangen. Die RNA wurde jeweils in ein 1,5 ml Plastik Tube pipettiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3.2.4 Abgewandeltes Peqlabprotokoll zur Gesamt-RNA Isolierung

Die oben beschriebenen Verfahren ergaben entweder eine zu geringe RNA-Gesamtkonzentration oder zu große Volumina im Verhältnis zur benötigten Gesamt-RNA-Konzentration. Da aus der Gesamt-RNA im weiteren Verlauf mRNA isoliert werden sollte, wurden recht hohe Konzentrationen hochreiner RNA benötigt. Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, wurde ausgehend vom Herstellerprotokoll von PeqGold RNAPure das folgende Protokoll erarbeitet. Pro 100 g Pilzkultur wurden 2 ml Peq Gold RNA Pure Lösung eingesetzt. Je Pilzpellet aus 50ml Flüssigkultur (Gewicht zwischen 1,6 und 2 g) wurden - je nach Gewicht des Pellets - 36-40 ml PeqGold RNAPure und salzsäuregewaschene Glasskugeln hinzugefügt. Es wurden so viele Glasskugeln hinzugegeben, dass die Oberfläche des Pilzpellets gerade vollständig bedeckt war. Die Probe wurde für 30 min bei Raumtemperatur gründlich gevortext, um eine gute Zellwandlyse hervorzurufen. Daraufhin wurde das Ganze für 5 min bei Raumtemperatur ruhig stehengelassen. Hierdurch wurde die Dissoziation der Nukleotidkomplexe gewährleistet. 35 ml der Probe wurden in ein neues 50 ml Cellstar-Polypropylenröhrchen überführt und 7 ml Chloroform hinzugegeben. Je eingesetztem Milliliter PeqGold RNA Pure sind nach Herstellerprotokoll 0,2 ml Chloroform nötig. Die Probe wurde für 15 sek. stark geschüttelt und dann für 5 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 10.000xg und 4°C. Die entstandene obere wässrige Phase wurde zu 9-10 ml

in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, die RNA mit dem gleichen Volumen an Isopropanol präzipitiert, alles einmal kurz gevortext und das Probenvolumen anschließend auf zwei 15 ml Cellstar-Polypropylenröhrchen zu je 9 ml aufgeteilt. Die Proben wurden danach 15 min bei 4°C inkubiert und 13 min bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit erst 2 ml und danach 1 ml 70% Ethanol. Der Überstand wurde jeweils verworfen und die Pellets für 10 min unter dem Abzug getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 23 µl RNase-freiem Aqua dest. eluiert und die Eluate derselben Kultur jeweils zusammengefasst. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.2.3.3 Isolierung von mRNA

3.3.3.3.1 PolyA Tract-Kit (Promega, Mannheim, D)

Aus 350 µg Gesamt-RNA wurde mRNA mit dem Kit PolyA-Tract mRNA Isolations System III und IV nach den Herstellerangaben isoliert. Mit diesem Kit wird die mRNA durch Hybridisierung der PolyA-Enden der mRNA an biotinylierte Oligo(dT)s und der Bindung dieser Hybride an Streptavidin-gekoppelte paramagnetische Partikel unter stringenten Bedingungen isoliert. Während die mRNA mittels Magnet gebunden werden kann, verbleiben rRNA und DNA in der Lösung und können entsprechend abpipettiert werden. Es wurden 350 µg Gesamt-RNA mit einem Volumen von 500 µl eingesetzt. Diese Konzentration entsprach der komplett isolierten Gesamt-RNA. Die Proben wurden zunächst bei 65°C für 10 min denaturiert. Zur RNA wurden dann 13 µl SSC 20x und 3 µl biotinylierte Oligo(dT) gemischt und das Ganze auf Raumtemperatur abgekühlt. Währenddessen wurden die Streptavidin-gekoppelten paramagnetischen Partikel (SA-PMPs) dreimal hintereinander mit je 300 µl SSC 0,5x gewaschen und in 100 µl SSC 0,5x resuspendiert. Die Oligo(dT)-mRNA-Hybride wurden vorsichtig mit den SA-PMPs gemischt. Damit sich die Hybride an die SA-PMPs anlagern konnten, wurde das Gemisch für 10 min bei RT inkubiert und gelegentlich durch vorsichtiges Umschwenken der Tubes gemischt. Somit konnten die restliche DNA und rRNA im magnetischen Ständer von den an die SA-PMPs angelagerten Hybriden getrennt werden. Diese Lösung wurde bis zum Ende des Isolierungsverfahrens aufbewahrt, bis sicher war, dass die mRNA-Gewinnung erfolgreich war. Die Probe wurde danach noch viermal mit je 300µl SSC 0,1x gewaschen und die mRNA schließlich in zwei

Schritten mit 100 µl und 150 µl RNase-freiem Aqua dest aus den SA-PMPs gelöst. Die mRNA wurde bei -70°C aufbewahrt. Leider gelang es mit diesem Protokoll nicht, genügend mRNA zu isolieren. Daher musste ein weiteres Protokoll hinzugezogen werden. Es wurde daraufhin eine weitere mRNA-Isolierung mit dem Dynabeads mRNA Purifikation Kit von Invitrogen durchgeführt.

3.3.3.3.2 Dynabeads mRNA Purification Kit (Invitrogen)

Mit dem Dynabeads mRNA Purification Kit wurden 350 µg Gesamt-RNA zu einem Volumen von 200 µl nach Herstellerangaben isoliert. Es war mit diesem Protokoll möglich, 1,5 µg mRNA sowohl aus Gesamt-RNA der Glycin-Kultur als auch aus Gesamt-RNA der Alanin-Kultur zu isolieren. Das Prinzip des Kits basiert auf der Paarung von polyA-Resten am 3' Ende der mRNA und den Oligo(dt)-Rückständen, die kovalent an die Oberfläche der Dynabeads gebunden sind. Die anderen RNA-Moleküle bzw. restliche DNA, werden nicht durch die Beads gebunden und somit abgewaschen. Zunächst wurde die RNA für 2 min auf 65°C erhitzt, um die Sekundärstruktur aufzulösen, und danach wurde die RNA sofort auf Eis gestellt. Gleichzeitig wurden 400 µl gut resuspendierter Dynabeads in ein 1,5 ml Plastikröhrchen pipettiert und für 30 Sekunden auf den DynaMag-Spin-Magneten gesetzt. Der Überstand wurde abpipettiert, das Plastikröhrchen vom Magneten genommen und die Dynabeads mit 200 µl Bindungs-Puffer kalibriert. Danach wurde die Probe wieder auf den Magneten gesetzt und nach 30 min der Überstand wieder abgenommen. Wiederum wurde die Probe vom Magneten genommen und die Beads in 200 µl Bindungs-Puffer gelöst. Wichtig war hierbei, dass das Volumen des Bindungs-Puffers 1:1 dem Volumen der RNA-Probe entsprach. Die Gesamt-RNA wurde daraufhin zur Dynabeads/Bindungs-Puffer-Suspension hinzugefügt und für 3-5 min manuell durch Schwenken bei RT gemischt. Hierdurch wurde es der mRNA ermöglicht, sich an die oligo(dt)s auf den Beads zu binden. Die Suspension wurde zweimal mit 400 µl Wasch Puffer B gewaschen und schließlich in 12 µl einer 10 mM Tris-HCL mit pH 7,5 eluiert. Damit sich die mRNA von den Dynabeads ablöst, wurde die Probe für zwei min auf 80°C erhitzt, auf den Magneten gesetzt, der Überstand mit der isolierten mRNA in ein neues RNase freies Plastikröhrchen überführt und bei -70°C gelagert.

3.3.3.4 Konzentrationsbestimmung

Nach jeder RNA-, bzw. DNA-Isolierung wurde die Konzentration der jeweiligen Nukleinsäuren mittels Photometer gemessen. Hierzu wurden die zu messenden Proben 1:50 verdünnt und in spezielle UV-Küvetten gefüllt. Die Extinktion wurde jeweils bei 260 und 280 nm bestimmt. Mit den so ermittelten Werten errechnete sich die Konzentration wie folgt:

Konzentration der DNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$

Konzentration der RNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ = $\text{OD}_{280} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$

Die Reinheit der Präparation von RNA ergibt sich aus dem Quotienten der $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ und liegt bei hoher Reinheit zwischen 1,8 und 2,1.

3.3.3.5 RNA-Gelelektrophorese

Um die Integrität der gewonnenen RNA zu überprüfen, wurde eine Formaldehyd-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 5 μl RNA-Isolat mit 9 μl Roti-Load-Gel Ladepuffer vermischt, in die Tasche des 1% denaturierenden Agarosegels gefüllt und bei 50 Volt für 30-40 min laufengelassen. Als Laufpuffer sowie als Gelgrundlage diente 10x Mops. Für das Gel wurden 0,3 g Agarose in 23 ml H_2O in der Mikrowelle aufgeköcht und danach auf ca. 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 3 ml 10x Mops und 5 ml 37% Formaldehyd hinzugefügt und in einen passenden Gelschlitten gegossen.

3.3.4 Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (cDNA-Subtraktion)

Die cDNA-Subtraktion ist eine leistungsfähige Methode, die den Vergleich zweier mRNA-Populationen ermöglicht und Klone liefert, welche in der einen Population exprimiert werden und in der anderen nicht. Das Besondere an dieser Methode ist, dass sie ohne Kenntnis des eigentlichen Genoms eines Organismus auskommt. Es wurden die mRNA-Populationen aus Glycin-Hypheninduktionskultur und aus Alanin-Negativkontrollkultur mittels PCR-Select-cDNA-Subtraction-Kit miteinander verglichen und eine cDNA-Subtraktion durchgeführt. Hierdurch sollten differentiell exprimierte Sequenzen ermittelt werden, die während der Glycin-abhängigen Hypheninduktion hochreguliert wurden. Putativ differentiell exprimierte Klone

wurden durch ein differentielles Screening mittels reverse Northern Blot überprüft. Zudem wurden die erhaltenen Sequenzen durch Sequenzierung weiter analysiert, da nach der Subtraktion immer noch ein sogenannter „Hintergrund“ zu erwarten ist (Diatchenko et al., 1996; Gurskaya et al., 1996).

3.2.4.1 Molekulare Grundlagen der cDNA-Subtraktion

In Abb. 2 sind die molekularen Abläufe der PCR-gestützten cDNA-Subtraktion dargestellt, die dem Benutzerhandbuch des Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraktions Kit entnommen sind. Aus der poly(A⁺)-RNA der zwei zu vergleichenden *Malassezia-furfur*-Kulturen wird jeweils die cDNA synthetisiert. Danach werden Tester und Driver mit Rsa I (Clontech) geschnitten, was in glatten DNA-Enden resultiert. Die Tester-cDNA wird auf zwei Portionen aufgeteilt und jede Hälfte mit einem unterschiedlichen cDNA-Adapter ligiert (Adapter 1 und Adapter 2R). Die Enden der Adapter besitzen keine Phosphatgruppe, sodass nur ein Strang eines jeden Adapters an das 5'-Ende der cDNA passt. Die beiden Adapter besitzen auch identische Sequenz-Abschnitte, was dazu führt, dass nach Auffüllung der fehlenden Adapterstränge die Anlagerung der PCR-Primer ermöglicht wird. Es folgen zwei Hybridisierungen und zwei PCR-Schritte. Im ersten Hybridisierungsschritt wird die Testerprobe mit einem Überschuss an Driver hitzedenaturiert und den Proben die Möglichkeit zur Anlagerung gegeben. Es entstehen daraufhin verschiedene Hybride, einzelsträngige (ss) und doppelsträngige (ds) cDNA-Moleküle, die entweder mit einem Adapter ligiert sind oder nicht. Speziell durch die ss cDNAs mit Adapter werden Konzentrationsunterschiede zwischen niedrig- und hochexprimierten Sequenzen ausgeglichen, da die Wiederanlagerung für hochexprimierte Moleküle, aufgrund der Kinetik zweiter Ordnung der Hybridisierung schneller erfolgt. Aufgrund der ss Testermoleküle mit Adapter werden die differentiell exprimierten Sequenzen signifikant angereichert, wohingegen die nicht differentiell exprimierten Sequenzen Doppelstränge mit den Driver-Sequenzen bilden. Im zweiten Hybridisierungsschritt werden die beiden ersten Hybridisierungsproben miteinander vermischt, ohne vorher denaturiert zu werden. Gleichzeitig wird frischer, denaturierter Driver hinzugefügt. Hierdurch ist es nur den übrig gebliebenen, normalisierten und subtrahierten ss Tester-cDNAs möglich, sich zusammenzulagern und neue Hybride zu bilden. Bei diesen handelt es sich um ds Tester-Moleküle, die mit unterschiedlichen Adaptern an

ihren Enden ligiert sind. Durch den hinzugefügten Driver werden die neuen ds Tester-cDNAs als differentiell exprimierte Sequenzen weiter angereichert. Alle in den vorangegangenen Hybridisierungsschritten entstandenen Moleküle werden mittels PCR amplifiziert, um gerade die gewünschten, differentiell exprimierten Sequenzen anzureichern. Während der PCR werden ss cDNAs mit und ohne Adapter und ds cDNAs ohne Adapter aufgrund der fehlenden Primerbindungsstellen nicht amplifiziert. Sequenzen, die zwar ds sind, jedoch an ihren Enden jeweils nur einen Adapter aufweisen, haben somit auch nur eine Primerbindungsstelle. Daher können diese Sequenzen nur linear amplifiziert werden. Die Tester cDNAs, die an beiden Enden jeweils die gleichen Adapter besitzen, bilden schleifenartige Strukturen aus (Suppressions PCR-Effekt), durch die eine Amplifikation nicht möglich ist. Diese sogenannte Suppression bedeutet, dass sich nach dem Denaturierungsschritt an den Enden der ss cDNA die komplementären Sequenzen der Adapter befinden. Während der Annealing-Schritte (Anlagerung) kommt es aufgrund der starken Hybridisierungskinetik dazu (diese Kinetik ist weitaus stärker, als die Anlagerung der kürzeren Primer), dass die Ausbildung von schleifenartigen Sekundärstrukturen die Primeranlagerung verhindern. Selbst wenn die Primeranlagerung einmal unspezifisch vorkommen sollte, würde im nächsten Zyklus die weitere Amplifikation des neu synthetisierten cDNA-Stranges durch den beschriebenen Effekt effizient unterdrückt. Das Ganze führt dazu, dass nur ds Tester-cDNAs mit zwei unterschiedlichen Adaptern exponentiell amplifiziert werden und die für das weitere Vorgehen notwendigen normalisierten, differentiell exprimierten Sequenzen darstellen. In einem weiteren, zweiten PCR-Schritt mit speziellen nested Primern werden nochmals unspezifische PCR-Produkte reduziert und differentiell exprimierte Sequenzen weiter angereichert.

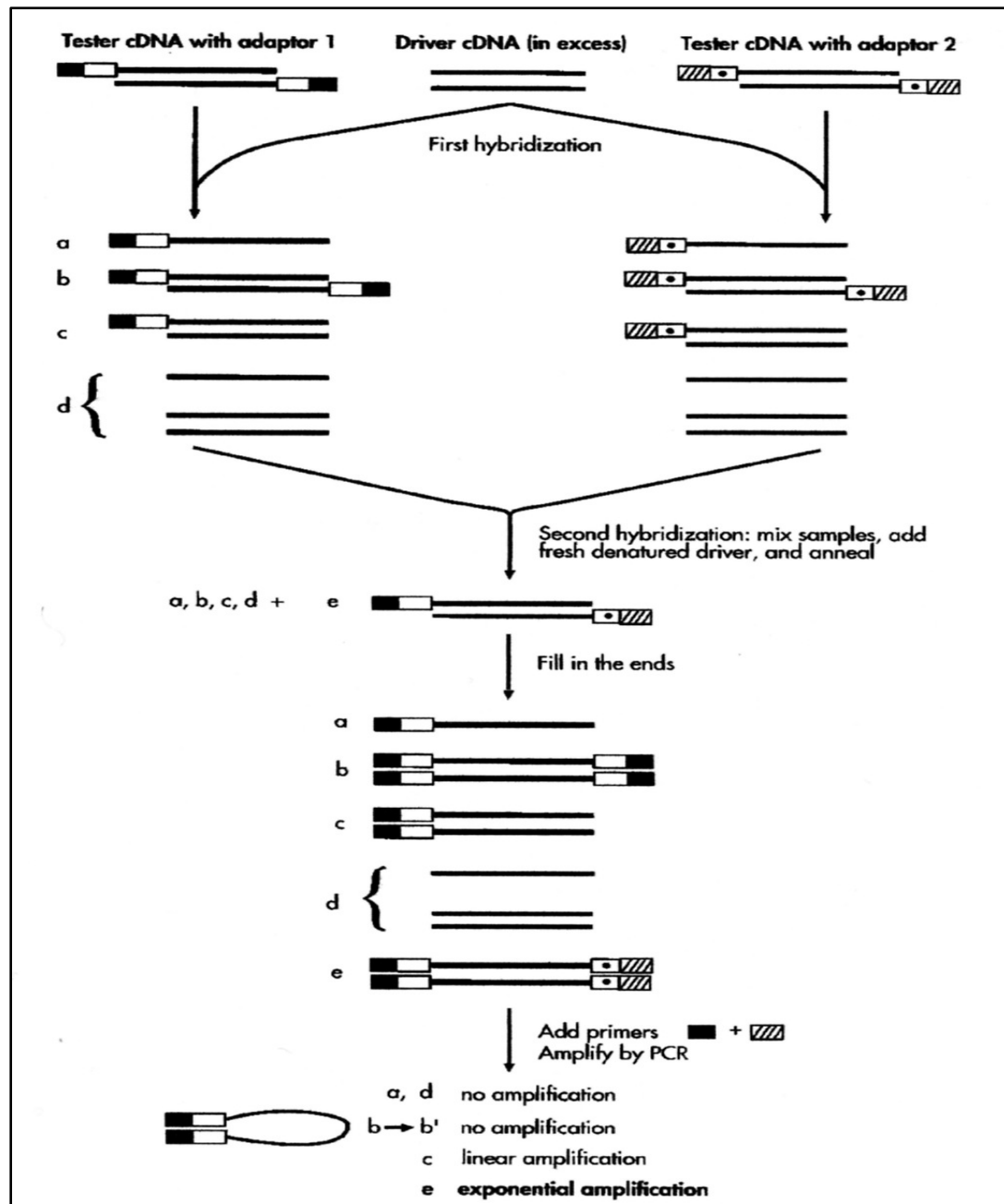


Abbildung 2: Schematische Darstellung der cDNA-Subtraktion

(Diatchenko et al., 1996)

3.3.4.2 Erst- und Zweitstrang-Synthese der cDNA

Es wurden jeweils 1,5 µg poly (A⁺)-RNA der Tester und Driver Kultur mit einem Volumen von je 10 µl mit 2 µl cDNA-Synthese Primer für 5 min bei 65°C im

Thermocycler erhitzt und danach kurz auf Eis inkubiert. Die Probe wurde daraufhin kurz anzentrifugiert und die Erststrang cDNA-Synthese 1,5 h bei 42°C durchgeführt (finale Konzentration: 0,75 µg mRNA (1,5 µg), 1 µM cDNA-Synthese Primer (10 mM), 2 U/µl AMV-Reverse Transkriptase (20 U/µl), 1x Erststrang Puffer (5x) und 1 mM dNTP-Mix (10 mM)). Dieser Schritt wurde im Hybridisierungssofen durchgeführt, um niedrigere Reaktionseffizienzen durch Verdunstung zu vermeiden. Zum Beenden der Reaktion wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und es wurde umgehend zur Zweitstrang cDNA-Synthese übergegangen. Bei der Zweitstrang cDNA-Synthese wurden der Probe (20 µl) 8 µl Enzymcocktail hinzugefügt, bestehend aus DNA-Polymerase I (6 U/µl), RNase H (0,25 U/µl) und E. coli DNA-Ligase (1,2 U/µl) (Clontech), und alles daraufhin für 2 h bei 16°C im Thermocycler inkubiert. Die Zweitstrang cDNA-Synthese Reaktion bestand in ihrer Endkonzentration aus 20µl der Erststrang-Synthese Reaktion, 1x Zweitstrang Puffer (5x), 0,2 mM dNTP-Mix (10 mM), 1x Zweitstrang Enzym Cocktail (20x) und 96,8 µl Aqua dest. Um glatte Enden zu erzeugen, wurden 6 U T4 DNA-Polymerase hinzugegeben und für weitere 30 min bei 16°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde dem Reaktionsgemisch 4 µl 20x EDTA/Glycogen Mix hinzugefügt. Die synthetisierte ds cDNA wurde mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gereinigt und mit NH₄OAc (Endkonzentration 400 mM) und 2 Vol. 100 % EtOH präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm/ 4°C für 20 min wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl Aqua dest. resuspendiert. Von der synthetisierten ds cDNA wurden 5 µl für eine Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt.

3.3.4.2.1. RSA I Digestion

Je 43,5 µl der synthetisierten ds Tester- und Driver-cDNA wurden mit *Rsa I* und *Rsa I*-Restriktions-Puffer versetzt (finale Konzentration: 1x RSA I Restriktions Puffer (10x), 0,3 U/ml RSA I (10 U/µl)), kurz gevortext und anzentrifugiert und für 1,5 h bei 37°C geschnitten, um kürzere, glatte ds cDNA-Fragmente zu erhalten. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 20x EDTA/Glycogen Mix wurden 5 µl der Probe aufgehoben, um die Effizienz der *Rsa I*-Spaltung durch Agarosegel-Elektrophorese zu analysieren.

3.3.4.3 Adapterligation

Bei der Adapterligation wurden an die *Rsa I* geschnittenen Tester-cDNA-Fragmente die jeweiligen Adapter ligiert. Das hatte den Zweck, dass nur Tester-cDNAs nach der Hybridisierung amplifiziert werden, nicht aber die Driver-cDNAs. Die Tester-cDNA wurde in zwei verschiedene Portionen aufgeteilt und mit einem jeweils unterschiedlichen Adapter ligiert. Somit entstanden Tester-cDNA 1 mit dem Adapter 1 und Tester-cDNA 2 mit dem Adapter 2R. Die Adapterligation wurde mit 400 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C durchgeführt, danach mit 1x EDTA/Glycogen Mix (0,2M EDTA; 1mg/ml Glycogen) gestoppt und die Ligase bei 72°C für 5 min hitzedeaktiviert. Der Master Mix für die Adapterligation bestand aus 3 µl sterilem H₂O, 2 µl 5x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl). Es wurde 1 µl einer jeden in dieser Reaktion anfallenden nicht subtrahierten Tester-Kontrolle 1c bzw. 2c in 1 ml Aqua dest. verdünnt und das Ganze bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren. Die Adapter-ligierten Tester-cDNAs wurden im nächsten Schritt hybridisiert.

Tabelle 5: Schematische Darstellung der Adapterligation

Adapterligation (wird mit Tester 2-1 und 2-2 wiederholt)	1 Tester 1-1	2 Tester 1-2
Gelöste Tester-cDNA	2µl	2µl
Adapter 1 (10µM)	2µl	-
Adapter 2R (10µM)	-	2µl
Master Mix	6µl	6µl
Endvolumen	10µl	10µl

3.3.4.4 Erste und zweite Hybridisierung

In diesem Schritt wurde ein Überschuß von Driver-cDNA zu jeder Probe Tester-cDNA hinzugefügt, das Ganze unter Hitze denaturiert und den Proben daraufhin die Möglichkeit zum *Annealing* (Anlagerung) gegeben. Daraus ergaben sich die Typ a,b,c und d Moleküle einer jeden Tester-cDNA. Die erste Hybridisierung fand bei einer Temperatur von 68°C in einem Zeitraum von 8 h statt. Die im Tester- und Driver-Pool überflüssigen cDNAs bildeten ds Hybride aus. Die verbleibenden ss cDNAs, die einer zweiten Hybridisierung zur Verfügung standen, waren dadurch mit differentiell exprimierten Sequenzen angereichert. Bei der zweiten Hybridisierung wurden die

während der ersten Hybridisierung entstandenen Proben miteinander vermischt, ohne vorher denaturiert zu werden, und es wurde frischer denaturierter Driver hinzugefügt. Hierbei entstanden völlig neue Hybride (Typ E) mit unterschiedlichen Adaptern an jedem Ende, die die differentiell exprimierten cDNAs des Testers repräsentierten. Die zweite Hybridisierung wurde bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Proben wurden dann entweder bei -20°C gelagert oder direkt in die sich anschließende PCR-Amplifikation eingesetzt.

Tabelle 6: Schematische Darstellung der Hybridisierungsschritte

1. Hybridisierung (wird mit Tester 2-1 und 2-2 wiederholt)	1 Tester 1-1	2 Tester 1-2
Rsa I verdaute Driver-cDNA	1,5µl	1,5µl
Adapter 1 ligierte Tester 1-1 cDNA	1,5µl	-
Adapter 2R ligierte Tester 1-2 cDNA	-	1,5µl
4xHybridisierungs Puffer	1,0µl	1,0µl
Endvolumen	4µl	4µl
Für 8 h bei 68°C		
2. Hybridisierung:		
Tester Proben vermischt, frischer denaturierter Driver hinzugefügt und bei 68°C über Nacht hybridisiert		

3.3.4.5 Erste und zweite PCR-Amplifikation

Durch die nächsten beiden PCR-Schritte war es möglich, die aus dem vorangegangenen Versuch differentiell exprimierten cDNAs selektiv zu amplifizieren. Die fehlenden Adapter wurden durch Erhitzen auf 75°C für fünf Minuten unter Zugabe einer Advantage cDNA-Polymerase aufgefüllt. Danach wurde die erste PCR mit Primer 1 durchgeführt. Dieser Primer kann sowohl an Adapter 1 als auch an Adapter 2R binden. Die PCRs wurden wie folgt angesetzt: 1x PCR-Reaktions Puffer (10x), 0,2 mM dNTP-Mix (10 mM), 0,4 µM PCR Primer 1 (10 µM), 1x Advantage cDNA-Polymerase Mix (50x) und mit 19,5 µl sterilem Aqua dest auf 24 µl aufgefüllt. Diesem Master Mix wurde 1 µl DNA-Template hinzugegeben. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Der Deckel des Thermocyclers hatte eine konstante Temperatur von 105°C. Die PCR bestand aus 29 Zyklen, bei der die Denaturierung für 30 sek bei 94°C, die Primeranlagerung (Annealing) für 30 sek bei

66°C und die Sequenzverlängerung (Elongation) für 1,5 min bei 72°C durchgeführt wurde. Die Proben wurden nach dem letzten Zyklus immer auf 4°C gekühlt. Bei der zweiten PCR handelt es sich um eine nested PCR, die mit dem PCR Produkt der ersten PCR und den *Nested* Primern 1 und 2R durchgeführt wurde. Diese Primer können sich auch hier sowohl an Adapter 1 als auch an Adapter 2R binden. Der Master Mix wurde wie folgt angesetzt: 1x PCR Reaktions-Puffer (10x), 0,4 µM Nested PCR-Primer 1 (10 µM), 0,4 µM Nested PCR-Primer 2R (10 µM), 0,2 mM dNTP-Mix (10 mM), 1x Advantage cDNA-Polymerase Mix (50x). Das Reaktionsgemisch wurde mit 18,5 µl sterilem Aqua dest. auf 24 µl aufgefüllt. Zu den 24 µl PCR Master-Mix wurde 1 µl Template hinzugefügt. Die PCR bestand aus 12 Zyklen, und hier wurde die Denaturierung für 30 sek bei 94°C, das Annealing für 30 sek bei 60°C und die Elongation für 1,5 min bei 72°C durchgeführt. Abschließend wurden die Proben bei 4°C gekühlt. Von jedem PCR-Produkt wurden 5 µl im Agarosegel (2 %/ 1× TAE/1µl EtBr) aufgetrennt und analysiert. Das PCR-Produkt der zweiten PCR enthält nun die differentiell exprimierten cDNAs der Testerpopulation. Diese kamen in unterschiedlicher Anzahl in der Original-mRNA vor und liegen nach dem cDNA-Subtraktionsverfahren in annähernd gleichen Verhältnissen vor.

3.3.5 Klonierung in *E. coli*

Die PCR-Produkte der zweiten Amplifikation wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit in einen PCR 2.1 TOPO TA Cloning Vektor inseriert und daraufhin in One shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* kloniert. Hierzu wurden jeweils 4 µl der PCR-Produkte aus der zweiten Amplifikation in den Vektor inseriert, indem 6 µl des Reaktionsgemisches (4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung, 1 µl TOPO Vektor und mit Aqua dest. auf 6 µl aufgefüllt) zunächst unter Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis gestellt wurde. Der hier verwendete Vektor PCR 2.1-TOPO ist ein Doppelstrang-DNA-Derivat des zirkulären, männlichen *E. coli* infizierenden Einzelstrang-DNA-Bakteriophagen M13 (München 13), der fremde nicht-virale DNA variabler Länge bei erhaltener Replikation aufnehmen kann. Der Vektor liegt zunächst in linearisierter Form vor. An den jeweiligen 3'OH-Enden befindet sich je ein T-Überhang. An diesen T-Überhang ist das Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia Virus* kovalent gebunden. Die PCR-Produkte der zweiten Amplifikation besitzen alle einen 3'OH-Adeninüberhang. Dieser wird durch

die *Taq*-Polymerase generiert und somit können sich die Enden der PCR-Produkte bevorzugt an die Enden der Vektoren binden und bilden somit Wasserstoffbrückenbindungen aus (sticky ends). Durch die Topoisomerase I werden nun die beiden Phosphodiester-Rückgrate des Isolates und des Vektors verknüpft und so der Vektor zum Plasmidring geschlossen. Bei dieser Reaktion wird das Enzym abgespalten. 2 µl des Vektor-Ligationsansatzes wurden in 50 µl One Shot TOP 10 Chemically competent *E.coli* hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Daraufhin wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert, für 30 sek im Wasserbad bei 42°C hitzegeschockt und auf Eis gestellt. Es wurden 250 µl auf Raumtemperatur erwärmtes SOC-Medium zur Probe hinzugegeben und das Ganze in einem Schüttelinkubator bei 37°C für 1 h bei 200 rpm inkubiert. Es wurden von jedem Transformationsansatz jeweils 50 µl, 100 µl und der Rest auf LB-Amp-Platten ausplattiert, die je 50 µg/ml Ampicillin (50 mg/ml Stammlösung) enthielten. Es wurde kein blau-weiß-Screening vorgenommen, sondern jeder einzelne Klon weiter untersucht.

3.3.5.1 Kolonie-PCR

Jeder einzelne *E. coli*-Klon wurde in eine Kolonie-PCR eingesetzt. Hierzu wurde ein wenig Bakterienmaterial einer Übernachtskultur mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 15 µl Aqua dest. in einem 500 µl Plastik Tube gelöst. Die Bakterien wurden für 5 min bei 95°C erhitzt, um die Zellwände aufzubrechen. Anschließend wurde der PCR Master Mix untergemischt und die PCR gestartet. Der Master Mix zu 10 µl enthielt für jede Reaktion in der Endkonzentration 1xPCR-Puffer (10x), 1,5 mM MgCl₂ (50 mM), 0,2 mM dNTPs (10 mM), 0,2 mM M13 Primer forward (10 mM), 0,2 mM M13 Primer reverse (10 mM) und 0,5 U *Taq*-Polymerase. Das Ganze wurde mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt. Die initiale Denaturierung und Aktivierung der *Taq*-Polymerase wurde für 2 min bei 95 °C durchgeführt. Anschließend folgen mit 35 Zyklen die Denaturierung für 30 sek bei 94°C, die Primeranlagerung (Annealing) für 30 sek bei 55°C und die Sequenzverlängerung (Elongation) für 1 min bei 72°C. Abschließend folgt einmalig die finale Elongation für 10 min bei 72°C und die Kühlung des fertigen PCR-Produktes bei 4°C. Während der gesamten PCR hat der Deckel des Thermo Cyclers eine konstante Temperatur von 105°C.

3.3.6 Reverser Northern Blot

Beim cDNA-Subtraktionsverfahren ist ein gewisser Hintergrund aus nicht differentiell exprimierten Sequenzen unvermeidbar. Daher wurden mittels reversem Northern Blot die putativ differentiell exprimierten Sequenzen einem weiteren Screening unterzogen. Dazu wurde jeder einzelne Klon in eine Kolonie-PCR eingesetzt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden daraufhin auf ein Agarosegel (1%/1xTAE/1µl EtBr) aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und schließlich auf eine Nylonmembran transferiert. Die geblottete DNA wurde dann mit DIG-gelabelten DNA-Sonden hybridisiert.

3.3.6.1 Gelelektrophorese

Nach jeder Kolonie-PCR wurden 25 µl des PCR-Produktes mit jeweils 5 µl 6x DNA-Loading Dye (Verhältnis 5:1) vermischt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Marker wurde eine DIG-gelabelte DNA-Leiter (Dig Molecular Weight Marker VI, DIG-labeled) zu 3 µl mit 1 µl 6x Loading Dye vermischt und dann auf das 1% Agarosegel aufgetragen. Für die Herstellung des Gels mit einem Volumen von 250 ml wurden 2,5 g Agarose in ein Becherglas gefüllt und mit 1x TAE-Puffer bis zur 250 ml Marke aufgefüllt. Das Ganze wurde dann in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde 1µl Ethidiumbromid hinzugegeben, alles auf dem Magnetprüher gut durchmischt und das Gel gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde für 1,5 Stunden bei 90 Volt laufengelassen und anschließend auf einem UV-Transilluminator dokumentiert. Vor dem eigentlichen Blot musste die doppelsträngige DNA zunächst in Einzelstränge aufgetrennt werden. Hierzu wurde das Gel für 2x15 min in Denaturierungslösung denaturiert und danach für 30 min in Neutralisierungslösung neutralisiert. Abschließend wurde das Gel in 20x SSC äquilibriert und der Blot aufgebaut.

3.3.6.2 Blotting

Der eigentliche Transfer der DNA vom Gel auf eine Membran mit Nukleinsäurebindenden Eigenschaften (Hybond™-N+) erfolgte mittels Kapillarblotting. Dazu wurde ein Streifen 3 MM Chromatographiepapier in 20x SSC getränkt und luftblasenfrei auf eine Glasplatte gelegt. Die überhängenden Ränder des Chromatographiepapiers reichten bis in mit 20x SSC gefüllte Fotoschalen, so dass das

Papier während des gesamten Transfers mit 20x SSC getränkt blieb. Das DNA-Gel wurde auch luftblasenfrei mit den Taschen nach unten darauf gelegt und die nicht vom Gel bedeckte Fläche mit Frischhaltefolie abgedichtet. Damit wurde verhindert, dass die Salzlösung am Gel vorbeilaufen konnte. Auf das Gel wurde luftblasenfrei ein entsprechend großes Stück positiv geladene Nylonmembran und darüber zwei ebenfalls in 20x SSC angefeuchtete 3MM Chromatographiepapierstücke gelegt. Dieses Blotting-Sandwich wurde mit einem Stapel saugfähigem Papier überschichtet und mit ca. 500 g Gewicht beschwert. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht für ca 16-20 Stunden. Im Anschluss wurde die Membran beschriftet, in 2x SSC gewaschen und bei 80°C für 2 Stunden gebacken. Dadurch wurde die DNA auf der Membran gebunden. Zum Schluß wurde die Membran in einen Plastikbeutel (autoklavierbare Entsorgungsbeutel, Roth) eingeschweißt und entweder bei 4°C im Kühlschrank gelagert oder direkt für die Hybridisierung weiterverwendet.

3.3.6.3 Dig-Labeling der Sonden

Die Markierung der Sonden erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers mit Digoxigenin-11dUTP. Bei DNA-Sonden wird DIG an Desoxyuridintriphosphat (dUTP) gekoppelt. Die Detektion erfolgt durch einen Anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit einem Reporter-Enzym gekoppelt ist, welches wiederum eine Farbreaktion (Lumineszenz) auslöst. DIG wird nur in gebundenem Zustand erkannt und stellt eine nicht-radioaktive Methode zur Sichtbarmachung von DNA dar. Als Sonden wurden Adapter-ligierte, nicht subtrahierte cDNAs aus dem ersten PCR-Schritt der cDNA-Subtraktion verwendet. Als Positivsonde diente cDNA der 6-Stunden Glycinkultur und als Negativsonde cDNA aus der 6-Stunden Alaninkultur. Es wurde jeweils für jede einzelne Sonde 1 µl PCR Produkt der Glycin- bzw. Alaninkultur als Template verwendet und einem PCR-Mix für DIG-Labeling zu 24 µl hinzugefügt. Der PCR-Mix setzte sich wie folgt zusammen: 1x PCR-Puffer (10x), 0,2 mM dNTPs und 0,07 mM DIG 11 dUTP (DIG-gelabelt:ungelabelt, 2:3), 0,4 µM Nested Primer 1 (10 µM), 0,4 µM Nested Primer 2R (10 µM), 1x BD Advantage cDNA Polymerase (10x) und mit Aqua dest. auf 24 µl auffüllen. Als Primer dienten der forward bzw. reverse M13 Primer, und die PCR wurde 30 sek bei 94°C, 30 sek bei 68°C und 90 sek bei 72°C bei einer Wiederholung von 15 Zyklen

durchgeführt. Die Deckeltemperatur betrug die gesamte Zeit ca. 105°C und die Probe wurde nach der PCR auf 4°C gekühlt.

3.3.6.4 Hybridisierung

Die fertig getrockneten Membranen wurden zunächst prähybridisiert. Hierzu wurde die Membran in eine Rollerflasche gegeben und auf bereits 42°C erwärmtes Dig Easy Hyb hinzugegeben. Das Ganze wurde dann im Hybridisierungssofen für 2 Stunden bei 42°C prähybridisiert. Danach wurde die Prähybridisierungsflüssigkeit abgegossen und in einem 50 ml Falcon Tube bei -20°C aufbewahrt, da sie bis zu dreimal wiederverwendet werden konnte. Die Membranen wurden daraufhin mit 50 ml Hybridisierungsflüssigkeit überschichtet und das Ganze bei 42°C über Nacht hybridisiert. Die Hybridisierungsflüssigkeit bestand jeweils aus 50 ml Dig Easy Hyb und 50 µl Dig-gelabelter Sonde. Bevor frische Dig-gelabelte Sonden für die Hybridisierung verwendet werden konnten, mussten sie erst 5 min bei 95°C im Thermo Cycler denaturiert werden. Sie wurden anschließend sofort auf Eis gestellt und in 68°C vorgewärmtes Dig-Easy Hyb gegeben. Sind die Sonden vorher schon einmal verwendet worden, mussten sie vor Gebrauch nur aufgetaut und schließlich für 10 min bei 68°C denaturiert werden. Sie konnten bis zu 5 mal wiederverwendet werden. In der Regel wurden die Membranen zunächst mit der Alaninsonde hybridisiert, gestrippt und dann mit der Glycinsonde hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgegossen und wieder bei -20°C eingefroren. Die Membranen wurden daraufhin zweimal für 5 min in Low Stringency Buffer und danach zweimal für 15 min in 68°C vorgewärmten High Stringency Buffer gewaschen.

3.3.6.5 Chemilumineszenz-Detektion

Für die Chemilumineszenz-Detektion wurden die Membranen als erstes für 5 min bei Raumtemperatur mit 100 ml Washing Buffer gewaschen und mit 100 ml Blocking Solution für 60 min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Blocking Solution verworfen und der Anti-Digoxigenin-Antikörper hinzugegeben. Hierzu wurde der Antikörper für 5 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und danach 2 µl von der obersten Schicht abgenommen. Der Antikörper wurde dann zu 20 ml Blocking Solution hinzugefügt, vermischt und mit der Membran zusammen für 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal

für 10 min in 100 ml Washing Buffer gewaschen und für 5 min in 30 ml Detection Buffer äquilibriert. Daraufhin wurde die Membran in einen aufgeschnittenen Entsorgungsbeutel gelegt und 500 µl Chemielumineszenz-Lösung gleichmäßig mäanderförmig auf der Membran verteilt. Der Beutel wurde schnell zugeklappt und die Chemielumineszenz-Lösung durch leichtes Verstreichen mit den Händen nochmal gleichmäßig verteilt. Die Chemielumineszenz-Lösung konnte für 10 min bei Raumtemperatur einwirken, bevor die Membran in einen neuen Beutel gegeben wurde und luftblasenfrei eingeschweißt wurde. Die Membranen konnten eingeschweißt im Dunkeln bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden. Innerhalb von 24 Stunden nahm die Lichtemission der Chemielumineszenz-gefärbten Membran zu, jedoch konnte die Membran bereits nach einer halben Stunde für die Schwärzung des Lumifilms verwendet werden. Der Lumifilm wurde mit der Membran zusammen in einer Röntgenkassette für ca. 10 min geschwärzt und dann mittels Entwicklungsautomat entwickelt. Die Lumifilme wurden eingescannt und die Hybridisierungsmuster der Glycin-Sonde mit denen der Alanin-Sonde verglichen.

3.3.6.6 Stripping der Dig-gelabelten DNA-Sonde

Nach abgeschlossener Chemielumineszenz Detektion wurde die Membran als erstes ca. 1 min mit Aqua dest. abgespült und anschließend zweimal bei einer Temperatur von 37°C in Stripping Solution gewaschen. Daraufhin wurde die Membran fünf Minuten lang bei Raumtemperatur in 2x SSC geschüttelt und zum Schluß entweder feucht eingeschweißt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, oder nochmal prähybridisiert. Wichtig für den gesamten Stripping-Vorgang war, dass die Membran nicht austrocknen durfte. Fertig gestrippte Membranen wurden zwei Stunden lang prähybridisiert.

3.3.7 DNA-Plasmid Mini-Preparation

Die *E. coli* Klone, die nach Abgleich der Lumifilme eine differentiell exprimierte Sequenz enthielten, wurden einer Plasmid Minipräparation unterzogen. Für die Plasmid Prep wurde das PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde der jeweilige Klon gepickt und in 5 ml LB-Flüssigmedium eingebracht. Die Kulturen wurden dann über Nacht bei 37°C und ca. 200 rpm in leichter Schräglage im steril verschlossenem Reagenzglas im

Schüttelinkubator inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Flüssigmedium ohne Zusatz von *E. coli*. Am nächsten Morgen wurden ca. 2 ml der entstandenen Zellsuspension in ein 2 ml Plastikröhrchen überführt und in Glycerolstocks zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert. Die 2 ml Röhrchen wurden für 5 min bei 16.000xg in einer Table Top Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 250 µl Resuspension Buffer (R3) mit RNase A resuspendiert, bis keine Zellklumpen mehr zu erkennen waren. Daraufhin wurden 250 µl Lysis Buffer (L7) hinzugefügt und das Ganze durch leichtes Schwenken des Röhrchens vermischt. Die Proben wurden für max. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden der Probe 350 µl Precipitation Buffer (N4) hinzugefügt und alles durch leichtes Schwenken des Plastikröhrchens vermischt, bis die Lösung homogen war. Die Probe wurde für 10 min. bei 12.000xg bei RT zentrifugiert, der Überstand auf eine Spin Column gebracht und der Rest verworfen. Die Säule wurde in ein 2 ml Wash-Röhrchen eingesetzt und für 1 min bei 12.000xg zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule wieder zurück auf das 2 ml Röhrchen gesetzt. Es wurden im weiteren Verlauf 500 µl Washing-Buffer (W10) auf die Säule gegeben und wiederum 1 min bei 12.000xg bei RT zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und ein Waschschriff mit 700 µl Washing Buffer (W9) mit anschließender Zentrifugation von 1 min bei 12.000xg angeschlossen. Die Säule wurde daraufhin noch einmal für 1 min bei 12.000xg zentrifugiert, um den restlichen Washing Buffer (W9) zu entfernen. Die Plasmid DNA wurde mit 75 µl TE Buffer (TE) eluiert, der direkt auf die Mitte der Säule gegeben und das Ganze für eine Minute bei RT inkubiert wurde. Abschließend wurde die DNA durch Zentrifugation für 2 min bei 12.000xg in einem 1,5 ml Plastikröhrchen aufgefangen und bei -20°C gelagert oder direkt für die anschließende Sequenzierung weiterverwendet.

3.3.7.1 Konzentrationsmessung

Die Konzentration der aufgereinigten Plasmid DNA wurde im Labor mit Hilfe eines Photometers direkt bestimmt. Hierzu wurden in der Regel 5 µl Plasmid DNA mit 95 µl Aqua dest. verdünnt, in eine Photometerküvette pipettiert und die Konzentration schließlich abgelesen. Die Konzentration betrug in der Regel mindestens 200-300

µg/ml mit einer Ratio zwischen 1,79 und 2,06. Für die anschließende Sequenzierung musste die jeweilige Konzentration dann noch richtig eingestellt werden.

3.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide, die differentiell exprimierte Sequenzen enthielten, wurde durch das Labor von SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) durchgeführt. Es wurde bei allen Proben eine Extendet Hot Shot Sequenzierung gewählt, die Leseweiten von ca. 1000 Basen und eine Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten ermöglicht. Hierzu wurde die Plasmid DNA mit einer Konzentration von 600-700 ng und 20 pmol des jeweiligen forward bzw. reverse Primer mit einem maximalen Volumen von 7 µl in ein 200 µl PCR-Tube pipettiert und das Ganze zum Sequenzieren geschickt. Als Primer für die forward Reaktion wurde der M13 forward Primer und für die reverse-Reaktion der M13 reverse Primer eingesetzt.

3.3.8.1 Sequenzanalyse und Blast Suche

Die Ergebnisse der Sequenzierungen konnten bei SeqLab über das eigene Kundenkonto abgerufen und daraufhin über das SeqMan-Programm (Lasergene Version 5, DNASTar) auf dem Rechner mit der Endung *.seq abgespeichert und auf ihre Qualität überprüft werden. Zunächst wurde die erhaltene Sequenz in das EditSeq-Programm überführt und geöffnet. Mit diesem Programm können Sequenz-Textfiles manuell korrigiert werden. In diesem Fall war das Programm nötig, um die differentiell exprimierten Sequenzen von dem Vektor und den M13 Primerresten zu befreien. Die Sequenzen konnten daraufhin mit der NCBI- und MIPS Datenbank abgeglichen werden. Die Sequenz wurde zunächst in den NCBI Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) kopiert und somit die Vektor- bzw. die Primerreste sichtbar gemacht. Die Basenzahlen zwischen dem Vektor und der differentiell exprimierten Sequenzen wurde auf die Sequenzen im EditSeq übertragen, an den entsprechenden Stellen geschnitten und der Vektor entfernt. So konnte man mit den eigentlichen Sequenzen weiter arbeiten und sie mittels Blast Suche analysieren. Die vom Vektor befreiten Sequenzen wurden weiterhin im EditSeq kopiert und mit der NCBI (National Centre for Biotechnology Information)-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf Homologien überprüft. Die Sequenzen wurden jeweils in die tblastx (translated vs translated)

Suche eingesetzt und abgeglichen. Mit Hilfe dieses Programms wurde die Nukleotidsequenz automatisch in eine Aminosäuresequenz übersetzt und mit allen bereits übersetzten Sequenzen verglichen, die sich in der Datenbank befinden. Es war mit diesem Programm möglich, alle sechs Leserahmen der Nukleotidsequenz gleichzeitig zu analysieren. Es wurde mit den Sequenzen außerdem auch eine blastn-Suche auf Nukleotid-Ebene durchgeführt. Die NCBI-Datenbank enthält Sequenzen und deren Informationen sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene bakterieller, viraler und eukaryoter Organismen. Die Datenbank von *Ustilago maydis* hingegen enthält nur Informationen zu *Ustilago maydis*. Bei diesem Pilz handelt es sich um einen Pflanzenpathogen, der ausschließlich Maispflanzen befällt und bei ihnen den Maisbeulenbrand auslöst. Da *Ustilago maydis* ein sehr naher Verwandter der *Malassezia*-Hefen ist, dessen hyphenassoziierte Gene bereits bekannt sind, wurde zusätzlich ein Abgleich mit der MIPS *Ustilago maydis* Gendatenbank (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) durchgeführt. Die besten Ergebnisse der Blast Suche in der NCBI-Gendatenbank wurden daraufhin zusätzlich mit dem MIPS Yeast FunCat (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>) genauer untersucht und möglichen Funktionen zugeordnet (Mewes et al., 2002; Ruepp et al., 2004). Um weitere Informationen über Sequenzhomologien und Stoffwechselfunktionen im Zusammenhang mit *Ustilago maydis* zu untersuchen, wurden die den Sequenzen zugeordneten Gene zusätzlich über die Pedant Gendatenbank des Helmholtz-Zentrums München (German research center for Environmental Health; <http://pedant.gsf.de/>) gesucht, Funktionen zugeordnet und diese Funktionen wiederum mit den Ergebnissen aus dem MIPS FunCat miteinander verglichen. Es wurde zum einen eine Liste der besten Treffer aus der NCBI- und der MIPS-Datenbank angefertigt. Zum anderen wurden weitere Tabellen erstellt, in denen die gefundenen Sequenzen anhand ihrer Ähnlichkeiten zu Sequenzen von *M. globosa*, *Ustilago maydis* und anderen Organismen zugeordnet und eingeteilt werden konnten. Mit dem SeqMan-Programm war es zusätzlich möglich, die einzelnen vom Vektor befreiten Sequenzen anhand von Sequenzüberschneidungen in verschiedene Contigs einzuteilen.

3.3.8.2 Literaturrecherche

Nachdem die Sequenzanalyse und die Blast-Suche abgeschlossen waren, wurde in der Literatur nach bereits bekannten Genen gesucht, die den gefundenen Sequenzen entsprachen oder mit ihnen in Zusammenhang gebracht werden könnten. Da das Genom von *Malassezia furfur* noch nicht vollständig sequenziert ist, wurde nach möglichen oder bereits bekannten Modellstoffwechselwegen bei *Ustilago maydis* und *Malassezia globosa* recherchiert und diese für die weitere Analyse zum Vergleich herangezogen. Bei *Malassezia globosa* ergab sich mitunter die Schwierigkeit, dass noch nicht genügend Literatur über die gefundenen Proteine vorhanden war, sodass sich die Literaturrecherche zum größten Teil auf *Ustilago maydis* beschränkte. Für die Literaturrecherche wurden sowohl die Suchmaschine Google sowie die Elektronische Zeitschriftenbibliothek der Uni Regensburg und die Datenbank von Pubmed genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstum und Kultivierung von *Malassezia*-Hefen

4.1.1 Fütterungsversuche und Hyphenwachstum der *Malassezia*-Hefen

4.1.1.1 Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* mit Glycin als Stickstoffquelle

Durch Versuche von Mayser et al. (1998a) konnte gezeigt werden, dass *Malassezia furfur* unter Zugabe der Aminosäure Glycin in der Lage ist, *in vitro* Hyphen auszubilden. Im Rahmen von Fütterungsversuchen konnten diese Erkenntnisse bestätigt werden. *Malassezia furfur* zeigt unter Zugabe der Aminosäure Glycin auf bzw. in einem Minimalnährmedium ein gleichmäßiges Hefezellwachstum und zusätzlich die Ausbildung von kurzen, dicken, segmentierten Hyphen. Um die Hyphenbildung weiter zu untersuchen, wurden weitere Fütterungsversuche auf verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt.

4.1.1.2 Hyphenbildung auf festem 1b-Mangelnährmedium

Es wurden unterschiedliche *Malassezia*-Spezies auf 1b-Minimalnähragar ausgestrichen. Hierbei handelte es sich um die Spezies *Malassezia furfur* 7019, *Malassezia globosa* CBS 7966, *Malassezia obtusa* 7968, *Malasszia pachydermatis* 1892, *Malassezia slooffiae* 12 und *Malassezia sympodialis* 7979. Nach sieben Tagen Inkubationszeit bei RT bildete *Malassezia furfur* 7019 kurze Hyphen aus. Bei den anderen *Malassezia*-Spezies konnte keine Hyphenbildung und nur ein geringes Wachstum bzw. bei *Malassezia globosa* kein Wachstum und keine Hyphenbildung unter diesen Laborbedingungen induziert werden. Die Abbildungen 3, 5, 7, 9, 11 und 13 zeigen die Morphologie der unterschiedlichen getesteten *Malassezia*-Spezies nach sieben Tagen Inkubationszeit. Deutlich kann man die Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* 7019 erkennen, die bei den anderen *Malassezia*-Spezies nicht auftrat. Die Bilder 4, 6, 8, 10 und 12 zeigen die jeweiligen Negativkontrollen der verschiedenen *Malassezia*-Spezies auf 1b-Alanin-Minimalnähragar. Man erkennt, dass unter Zugabe der Aminosäure Alanin keine Hypheninduktion nach 7 Tagen Inkubationszeit bei Raumtemperatur möglich ist.

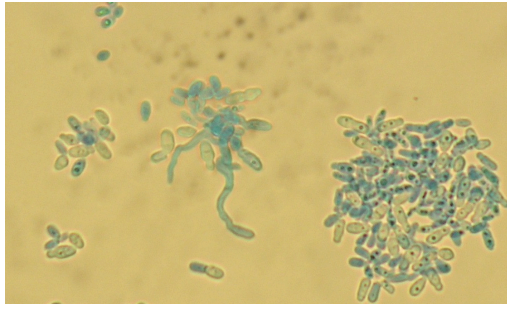


Abbildung 3: Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* 7019 unter Glycin-Zugabe; 1b Agar

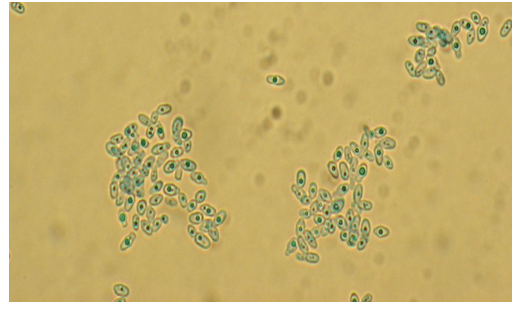


Abbildung 4: *Malassezia furfur* 7019 unter Alanin-Zugabe; 1b Agar

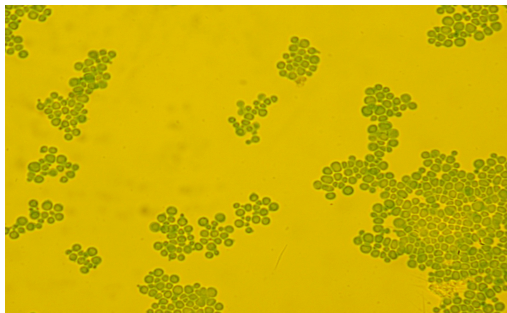


Abbildung 5: *Malassezia globosa* CBS 7966 unter Glycin-Zugabe, 1b Agar

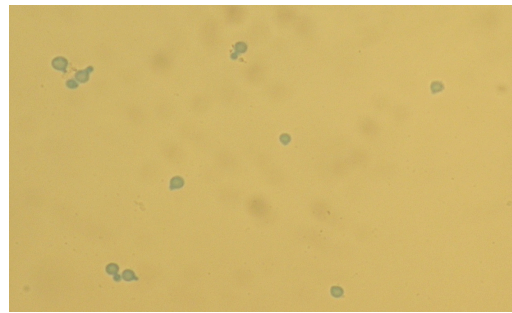


Abbildung 6: *Malassezia globosa* CBS 7966 unter Alanin-Zugabe, 1b Agar

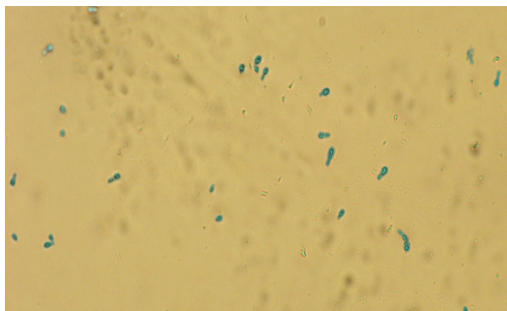


Abbildung 7: *Malassezia obtusa* 7968 unter Glycin-Zugabe, 1b Agar

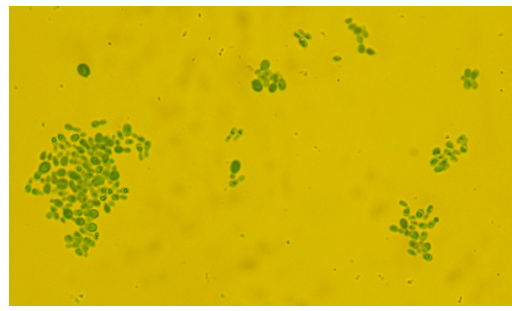


Abbildung 8: *Malassezia obtusa* 7968 unter Alanin-Zugabe, 1b Agar

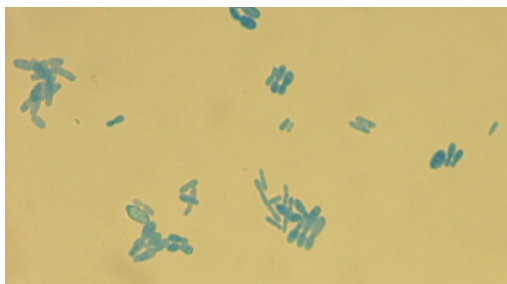


Abbildung 9: *Malassezia pachydermatis* 1892 unter Glycin-Zugabe, 1b Agar

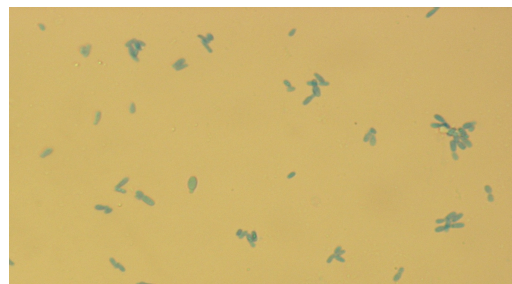


Abbildung 10: *Malassezia pachydermatis* 1892 unter Alanin-Zugabe, 1b Agar

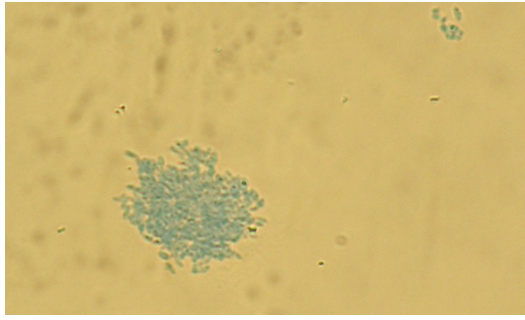


Abbildung 11: *Malassezia slooffiae* 12 unter Zugabe von Glycin, 1b Agar

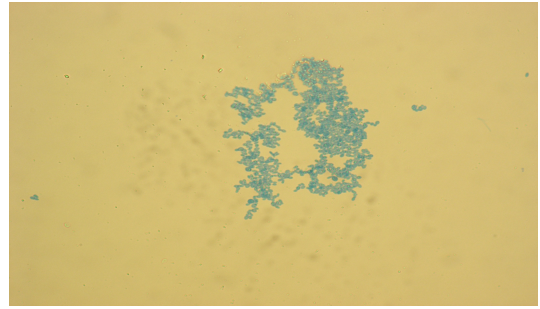


Abbildung 12: *Malassezia slooffiae* 12 unter Zugabe von Alanin, 1b Agar

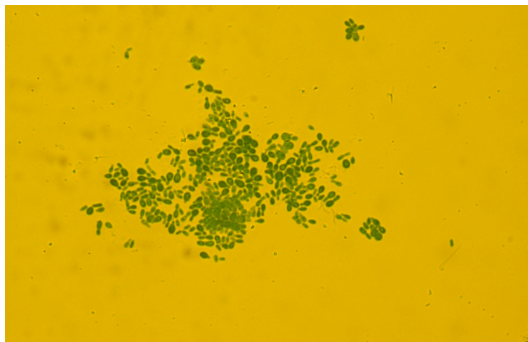


Abbildung 13: *Malassezia sympodialis* 7979 unter Zugabe von Glycin, 1b Agar

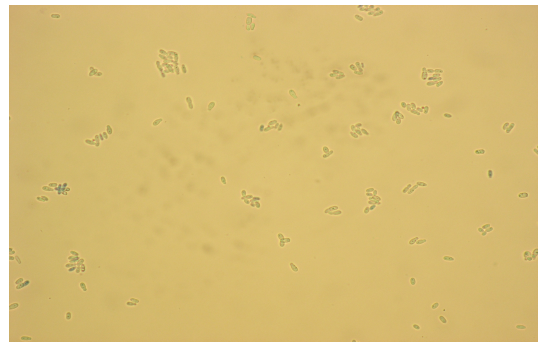


Abbildung 14: *Malassezia sympodialis* 7979 unter Zugabe von Alanin, 1b Agar

Für die Untersuchungen wurden die *Malassezia*-Sproßzellen und die Hyphen mikroskopisch im Nativpräparat mit 100-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop (Dialux, Leitz, Wetzlar) dargestellt. Ein wenig Pilzmaterial wurde auf dem Objektträger mit 1-2 Tropfen steriler, isotonischer Kochsalzlösung versetzt und unter dem Mikroskop angesehen.

4.1.1.3 Hyphenbildung in flüssigem Minimalnährmedium unter Berücksichtigung verschiedener Bedingungen

In Vorversuchen wurde das Wachstum und die Hyphenbildung bei den zu untersuchenden *Malassezia*-Spezies in flüssigem Minimalnährmedium unter Zusatz der Aminosäuren Glycin bzw. Alanin untersucht. Es wurden jeweils 15 mM Glycin und Alanin für die jeweiligen Medien verwendet. Es gibt keine Abhängigkeit von der Dosis. Die Aminosäure Glycin diente der Hypheninduktion und die Aminosäure Alanin als Negativkontrolle. In diesem Zusammenhang ergaben sich identische Bilder wie auf dem festen 1b-Nährmedium. Unter Zugabe von Alanin bildeten *in vitro* keine der *Malassezia*-Spezies Hyphen, während die Hypheninduktion unter Zugabe von Glycin bei RT auf dem Magnetrührer ohne weitere besondere Einflüsse bei

Malassezia furfur gelang. Bei allen anderen *Malassezia*-Hefen war es auch unter Glycin-Zugabe nicht möglich, Hyphen zu induzieren (Im Unterschied zum festen 1b-Nährmedium war es im flüssigen Nährmedium innerhalb nach 26 Stunden möglich, eine Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* herbeizuführen). *Malasszia globosa* konnte in diesem Zusammenhang nicht weiter untersucht werden, da es *in vitro* nicht gelang, diese Hefe im Minimalnährmedium über einen längeren Zeitraum am Leben zu erhalten bzw. ein Wachstum herbeizuführen. Um weitere Faktoren auszuschließen, die bei der Hyphenbildung eine Rolle spielen könnten, wurde der Versuch modifiziert. Hierzu wurde untersucht, ob die Sauerstoff- bzw. CO₂-Spannung einen Einfluss auf die Hyphenbildung haben. Die Hyphenbildung wurde auch unter anaeroben Bedingungen und bei unterschiedlichem Oberflächen-Volumen-Verhältnis, wie in den Kapiteln 3.3.2.2.3, 3.3.2.2.4 und 3.3.2.2.5 beschrieben, untersucht. Tabelle 7 zeigt die Hyphenbildung der verschiedenen *Malassezia*-Spezies *in vitro* im Zusammenhang mit den Hypheninduktionsversuchen.

Tabelle 7: Überblick über das Hyphenwachstum bei den verschiedenen *Malassezia*-Spezies *in vitro*

	Unter Glycin-Zugabe	Unter Alanin-Zugabe	Unter erhöhter O ₂ -Spannung	Unter erhöhter CO ₂ -Spannung	Unter anaeroben Bedingungen
<i>M. furfur</i> CBS 7019	Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung
<i>M. globosa</i> CBS 7966	Kein Zellwachstum	Kein Zellwachstum	Kein Zellwachstum	Kein Zellwachstum	Kein Zellwachstum
<i>M. obtusa</i> 7968	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung
<i>M. pachydermatis</i> 1892	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung
<i>M. sloofiae</i> 12	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung
<i>M. sympodialis</i> 7979	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung	Keine Hyphenbildung

4.1.1.4. Hyphenbildung unter Berücksichtigung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass neben der Aminosäure Glycin ein zweiter Faktor für die Hyphenbildung von entscheidender Bedeutung ist. Es handelt sich bei diesem Faktor um das Verhältnis zwischen der Oberfläche, die das Medium zur Luft hat, und dem Volumen des Mediums. Die Hyphen bilden sich nur ausreichend, wenn das Medium auf einer großen Oberfläche aufgetragen wird, sodass alle Zellen regelmäßig Kontakt zur Außenluft haben. Bei diesen Versuchen wurde nur *Malassezia furfur* 7019 untersucht. Die Untersuchungen, bei denen *Malassezia furfur* 7019 in verschiedenen großen Bechergläsern und Erlenmeyerkolben inkubiert wurde, blieben erfolglos. Hyphenbildung konnte in keinem der Gefäße induziert werden. Anders verhielt es sich bei den verschiedenen großen Schott-Glasflaschen. In jeder der Schott-Flaschen bildete *Malassezia furfur* Hyphen aus. Die ersten Hyphen wurden nach 26 Stunden im 2 l Gefäß beobachtet. Im 1 l Gefäß bildeten sich nach 29 Stunden Hyphen aus und im 500 ml Gefäß nach 30 Stunden. Tabelle 8 zeigt die Zahl der gebildeten Hyphen in den unterschiedlich großen Schott-Glasflaschen in Abhängigkeit von der Zeit. In Tabelle 9 ist zu erkennen, dass zu verschiedenen Zeiten im Alanin-Flüssigmedium teilweise auch Hyphen zu erkennen waren. Diese Erkenntnis ist allerdings aufgrund der Unregelmäßigkeit und des geringen Auftretens im Gesamtbild zu vernachlässigen.

Tabelle 8: Anzahl der Hyphen im Glycin-Flüssigmedium unter Bebrütung bei Raumtemperatur im Verlauf von 72 Stunden (h)

Bebrütungsdauer	2l Schott Flasche OVV: $\frac{145,27 \text{ cm}^2}{400 \text{ ml}} = 0,36$			1l Schott Flasche OVV: $\frac{80,12 \text{ cm}^2}{400 \text{ ml}} = 0,2$			500ml Schott Flasche OVV: $\frac{58,09 \text{ cm}^2}{400 \text{ ml}} = 0,1$		
	n	MW	In 1ml FM	n	MW	In 1ml FM	n	MW	In 1ml FM
1h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fortsetzung auf Seite 69									

Fortsetzung von Tabelle 8 von Seite 68									
26h	15	3	7.500	0	0	0	0	0	0
29h	37	7,4	18.500	4	0,8	2.000	0	0	0
30h	55	11	27.500	7	1,4	3.500	1	0,2	500
32h	145	29	72.500	5	1	2.500	1	0,2	500
48h	961	192,2	480.500	1	0,2	500	1	0,2	500
51h	1106	221,2	553.000	2	0,4	1.000	1	0,2	500
72_h	1710	342	855.000	2	0,4	1.000	2	0,4	1.000

OVV: Oberflächen -Volumen –Verhältnis (Verhältnis Oberfläche Medium zur Luft)

n: Anzahl der ausgezählten Hyphen aus 5 Kleinquadraten der Neubauer Zählkammer

MW: Mittelwert der ausgezählten Hyphen

FM: Flüssigmedium

Tabelle 9: Anzahl Hyphen im Alanin-Flüssigmedium unter Bebrütung bei Raumtemperatur im Verlauf von 72 Stunden (h)

Bebrütungsdauer	2l Schott Flasche OVV: $\frac{145,27 \text{ cm}^2}{400 \text{ ml}} = 0,36$			1l Schott Flasche OVV: $\frac{80,12 \text{ cm}^2}{400 \text{ ml}} = 0,2$			500ml Schott Flasche OVV: $\frac{58,09 \text{ cm}^2}{400 \text{ ml}} = 0,1$		
	n	MW	In 1ml FM	n	MW	In 1ml FM	n	MW	In 1ml FM
1h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26h	1	0,2	500	0	0	0	0	0	0
29h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30h	0	0	0	4	0,8	0	0	0	0
32h	0	0	0	1	0,2	500	0	0	0
48h	2	0,4	1.000	2	0,4	1.000	0	0	0
51h	1	0,2	500	1	0,2	500	0	0	0
72h	0	0	0	0	0	0	0	0	0

OVV: Oberflächen -Volumen –Verhältnis (Verhältnis Oberfläche Medium zur Luft)

n: Anzahl der ausgezählten Hyphen aus 5 Kleinquadraten der Neubauer Zählkammer

MW: Mittelwert der ausgezählten Hyphen

4.2. Molekulargenetische Versuche

4.2.1 Gesamt RNA- Isolierung

Da aus der Gesamt-RNA im weiteren Verlauf eine Aufreinigung der Poly(A⁺)-RNA durchgeführt wurde, wurden hohe Konzentrationen hochreiner RNA benötigt. Die einzelnen Gesamt-RNA-Isolate wurden gepoolt, bis eine Konzentration von 350µg Gesamt-RNA erreicht war.

4.2.2 mRNA- Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde aufgereinigt, um reine poly(A⁺)-RNA zu gewinnen. Es konnte nur poly(A⁺)-RNA in das cDNA-Subtraktionsverfahren eingesetzt werden und somit ein cDNA-Pool hergestellt werden. Insgesamt wurde sowohl die Gesamt-RNA aus der Glycin-Kultur als auch die Gesamt-RNA der Alanin-Kultur zu ca. 350µg/200µl in die m-RNA-Isolation eingesetzt. Daraus konnten jeweils erfolgreich 1-1,5 µg/10 µl m-RNA aufgereinigt und in das cDNA-Subtraktionsverfahren eingesetzt werden. Hierzu wurde das Dynabeads mRNA Purification Kit von Invitrogen verwendet.

4.2.3 cDNA-Subtraktionsverfahren

Die cDNA-Subtraktion wurde 6 Stunden nach Hypheninduktion durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 1,5 µg mRNA aus Glycin- und Alaninkultur in das Subtraktionsverfahren eingesetzt und die Versuche gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die PCR-Amplifikation der subtraktiv hybridisierten cDNA stellt den letzten Schritt des Subtraktionsverfahrens dar. Hier wurden die differentiell exprimierten cDNAs selektiv amplifiziert. Die fehlenden Adapterenden für die PCR-Primer 1 Bindungsstellen wurden aufgefüllt und anschließend wurden die PCR-Schritte durchgeführt. In der ersten PCR kam es zur exponentiellen Vermehrung der cDNAs, bei denen unterschiedliche Adaptersequenzen an beiden Enden vorlagen. Bei der zweiten PCR handelte es sich um eine *nested PCR*. Bei dieser PCR kam es zu einer Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen und zu einer Reduzierung des sogenannten Hintergrundes. Das Ergebnis des cDNA-Subtraktionsverfahrens ist in Abb. 15 zu erkennen. Die erste Bande von links nach rechts gesehen stellt einen

1 kb plus Marker (Fermentas) dar, die zweite Bande zeigt die subtrahierte cDNA aus Glycin-Kultur und die dritte Bande zeigt die nicht subtrahierte cDNA aus Glycin-Kultur. Die folgenden 2 Banden von links nach rechts gesehen stellen einmal die subtrahierte cDNA und die nicht subtrahierte cDNA aus der Alanin-Kultur dar. Auf dem Gelbild ist zu erkennen, dass sich die Bandenmuster der subtrahierten cDNAs deutlich von denen der nicht subtrahierten cDNAs aus Glycin- und Alanin-Kultur unterscheiden. Desweiteren unterscheiden sich auch die jeweiligen Bandenmuster der subtrahierten bzw. der nicht subtrahierten cDNA untereinander. Der erkennbare Unterschied zwischen den subtrahierten und den nicht subtrahierten Proben bestätigt, dass das cDNA-Subtraktionsverfahren erfolgreich war. Die unterschiedlich stark ausgeprägten Banden der subtrahierten cDNAs repräsentieren die bei der Subtraktion angereicherten DNA-Fragmente und somit die potentiell differentiell exprimierten Sequenzen. Die nicht-subtrahierten cDNAs sind charakterisiert durch ein weitaus stärkeres Bandenmuster, welches zum Teil einen unspezifischen „Schmier“ darstellt.

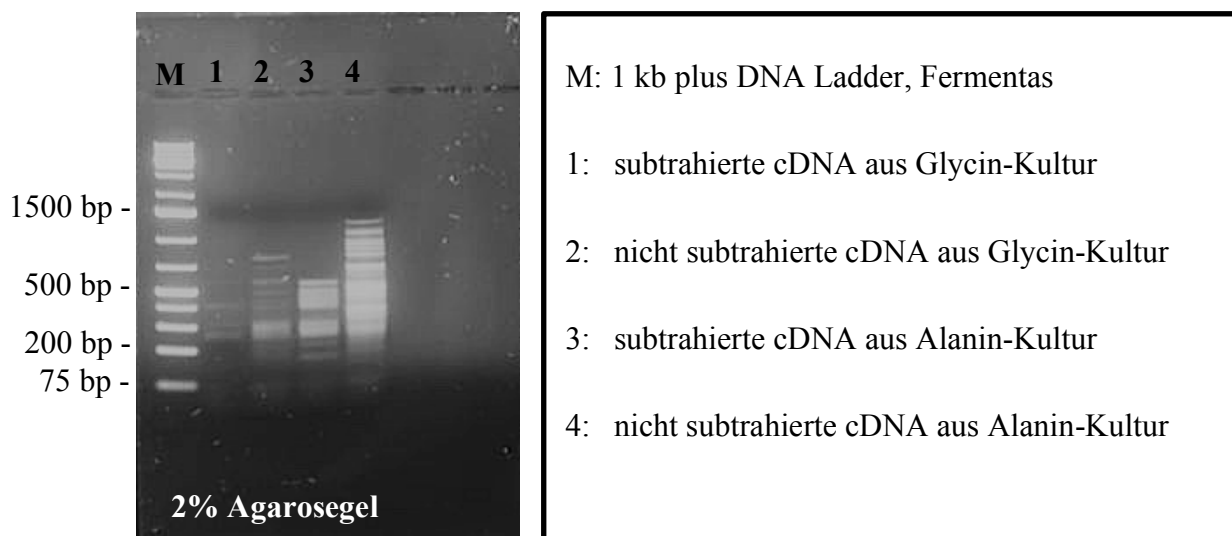


Abbildung 15: cDNA-Subtraktion nach 6 Stunden; Die Bandenmuster der subtrahierten cDNA unterscheiden sich deutlich von der nicht subtrahierten cDNA der Gly- und Ala- Kulturen

4.2.4 Klonierung der subtrahierten cDNA

Das PCR-Produkt der zweiten Amplifikation des cDNA-Subtraktionsverfahrens wurde mittels TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen in einen 2.1-TOPO Vektor inseriert und im Anschluß in One Shot Top 10 chemically competent *E. coli* Zellen transformiert. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurden aus einem Teil der Klone die Plasmide ausgebaut und mit *Eco RI* verdaut. Diese Untersuchung diente nur einer generellen Überprüfung, ob die Klonierung erfolgreich war, und es wurden sowohl positive als auch negative Klon-Kolonien untersucht. Daher fällt die Anzahl der tatsächlich eingebauten Plasmide in Abb. 16 relativ gering aus. Im anschließenden Screening wurden die Klone, die im Reversen Northern Blot nur mit der Glycin-Sonde hybridisierten, gezielt selektiert. Abb. 16 zeigt ein Beispiel für die Überprüfung der Klonierung in *E. coli*.

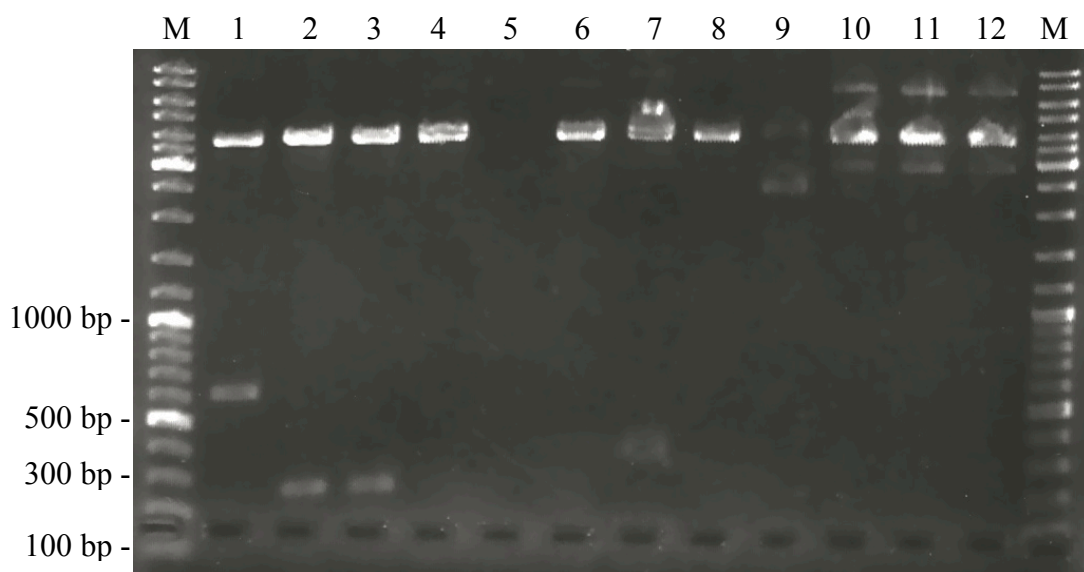


Abbildung 16: Darstellung eines Verdaus extrahierter Plasmide zur Kontrolle der Klonierung. Bei den Klonen Nr. 1-12 wurden die Plasmide extrahiert und diese mit *EcoRI* verdaut. Ein erfolgreicher Plasmideinbau ist bei den Proben 1, 2, 3 und 7 zu erkennen. Es handelt sich dabei um cDNA-Fragmente von einer Größe zwischen 200 und 600 bp

M: 1 KB Plus DNA- Ladder (Invitrogen)

1-12: Klon Nr. 1-12

4.2.5 Screening der Sequenzen nach 6 Stunden

Insgesamt konnten nach der Klonierung etwa 991 Klon-Kolonien vereinzelt werden. Jeder einzelne Klon wurde einer Kolonie-PCR mit einem anschließenden Screening auf differentiell exprimierte Sequenzen mittels Reverse Northern Blot unterzogen. Die Plasmide der positiven Klone, die im reversen Northern Blot nur mit der Glycin Sonde hybridisierten, wurden extrahiert und zum Sequenzieren geschickt. Hierdurch wurde die erfolgreiche Insertion der differentiell exprimierten Sequenzen überprüft. Von den 991 Klon-gescreenten Kolonien konnten 83 erfolgreich sequenziert werden, und 65 wiesen wiederum signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen auf. Die cDNA-Klone besitzen ein cDNA-Insert mit einer Fragmentlänge von ca. 200 kb bis 500 kb. Diese cDNA-Fragmente repräsentieren die subtrahierte cDNA-Bibliothek. Abb. 17 zeigt ein Beispiel für die Darstellung differentieller Expression im reversen Northern Blot.

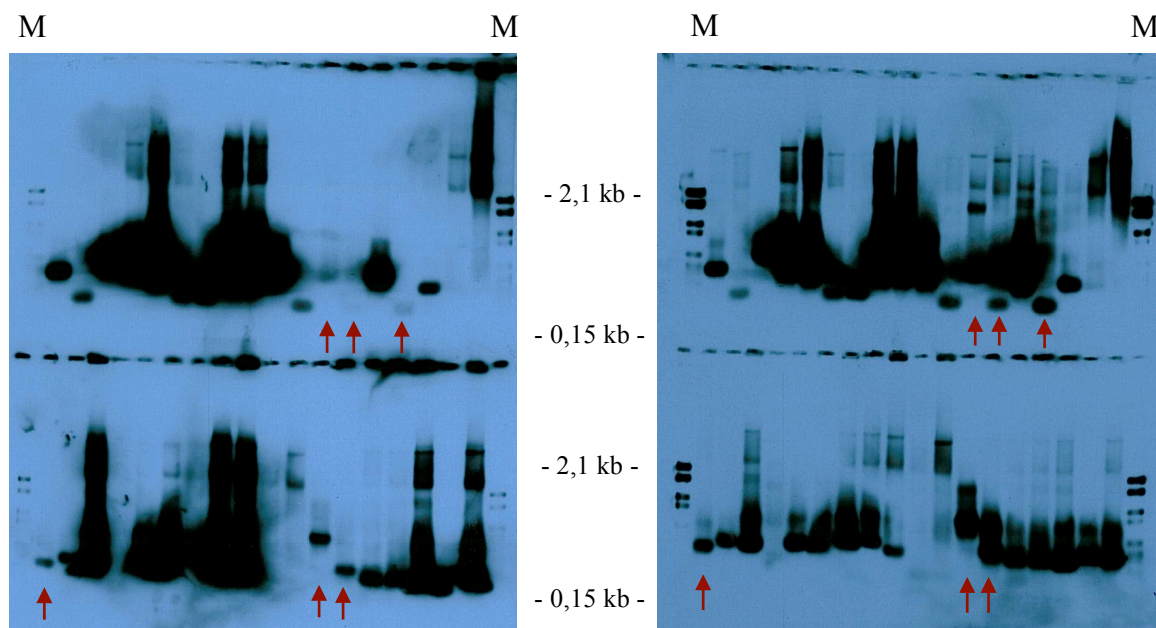


Abbildung 17: Darstellung der Hybridisierung der Sequenzen 109-144

Links: Proben Nr. 109-144 mit Alanin-Sonde hybridisiert. Rechts: Proben Nr. 109-144 mit Glycin-Sonde hybridisiert. Man kann deutlich eine unterschiedlich starke Bindung der Sonden erkennen. Die roten Pfeile markieren auf beiden Abbildungen in der oberen Reihe die Proben 120, 121, 123 und in der unteren Reihe jeweils die Proben 128, 138 und 139 (von links nach rechts gelesen). Die Proben Nr. 120, 121, 123 hybridisieren nahezu nur mit der Glycin-Sonde, während die Proben Nr. 128, 138 und 139 deutlich stärker mit der Glycin-Sonde als mit der Alanin-Sonde hybridisieren

4.2.6 Sequenzierung, Blast-Suche und Sequenzanalyse

Jede der differentiell exprimierten Sequenzen, die erfolgreich sequenziert wurden, wurden in der NCBI Datenbank einer translated vs. translated blast-Suche (tblastx) und einer blastn-Suche auf Nukleotid-Ebene unterzogen, als auch mit Hilfe der GenRe MIPS *Ustilago maydis* Datenbank weiter untersucht. Die Ergebnisse der Blast-Suche sind den Tabellen 10-13 zu entnehmen. In Tabelle 10 wurden die Ergebnisse unter Berücksichtigung des MIPS Yeast FunCat anhand ihrer wahrscheinlichen Funktionen eingeteilt. Hierbei wurde besonders auf Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus *Malassezia globosa* und *Ustilago maydis* geachtet. *Malassezia globosa* spielt in diesem Zusammenhang eine große Rolle, da diese Hefe der nächste Verwandte von *Malassezia furfur* ist und dessen Genom zudem vollständig sequenziert ist. Der Pflanzenpilz *Ustilago maydis* ist von Bedeutung, da er ein sehr naher Verwandter der *Malassezia*-Hefen ist, dessen hyphenassoziierte Gene bereits bekannt sind. Die Nummerierung der Ergebnisse ist mit der Nummerierung der einzelnen Klone identisch, so dass jederzeit nachvollzogen werden kann, welcher Klon zu welcher Sequenz und welche Sequenz wiederum welchem Protein oder einer hypothetischen Funktion zugehörig ist. Häufig konnten die Proteine mehreren Kategorien des MIPS Yeast FunCat zugeordnet werden, allerdings wurde in diesen Fällen die dominanteste Kategorie gewählt.

Tabelle 10: Einteilung der BLAST-Search-Ergebnisse der Sequenzen anhand ihrer hypothetischen Funktionen

Klon Nr.	Bester Treffer Gen Nummer (Accession Nr.)	Hypothetische Funktion
Stoffwechsel		
Stickstoff, Schwefel und Selen Stoffwechsel		
212	<i>Pseudomonas putida</i> CP000712.1	Features in this part of subject sequence: cyanate lyase
4	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
77	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
82	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
84	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
88	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
103	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein

Fortsetzung von Tabelle 10 von Seite 74		
5	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05632.1	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
78	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05632.1	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
83	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05632.1	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
85	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05632.1	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
89	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05632.1	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
104	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05632.1	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
639	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05632.1	IscU_like; Iron sulfur cluster scaffold like protein
Stoffwechsel von Vitaminen, Kofaktoren und Prothetischen Gruppen		
508	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04081	Gst.; related to Glutathione-S-Transferase
347	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04081	Gst.;related to Glutathione-S-Transferase
428	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04081	Gst.; related to Glutathione-S-Transferase
499	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04081	Gst.; related to Glutathione-S-Transferase
584	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04081	Gst.; related to Glutathione-S-Transferase
660	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04081	Gst.; related to Glutathione-S-Transferase
25	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 CP000463	Complete genome (Features in this part of subject sequence: Glutathion-S-Transferase)
73	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 CP000463	Complete genome (Features in this part of subject sequence: Glutathion-S-Transferase)
94	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 CP000463	Complete genome (Features in this part of subject sequence: Glutathion-S-Transferase)
Energie		
16	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM01753	GCY1- galactose-induced protein of aldo/keto- reductase family (AKRs)
17	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2886	GCY1- galactose-induced protein of aldo/keto- reductase family (AKRs)
506	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM01753	GCY1- galactose-induced protein of aldo/keto- reductase family (AKRs)
507	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2886	Aldo_ket_red; Aldo-keto reductases (AKRs)
657	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2886	Aldo_ket_red; Aldo-keto reductases (AKRs)
658	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM01753	GCY1- galctose-induced protein of aldo/keto- reductase family (AKRs)
Zellzyklus und DNA-Entwicklung		
2	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ16261	mTERF domain-containing protein 2
10	<i>Platanus x acerfolia</i> AM397241	Putative Ty1-copia reverse transcriptase (RT- Gene) and partial DfRedu pseudogene

Fortsetzung von Tabelle 10 von Seite 75		
422	<i>Platanus x acerfolia</i> AM397241	Putative Ty1-copia reverse transcriptase (RT-Gene) and partial DfRedu pseudogene
Protein Synthese		
198	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2586	Ribosomal protein L24e L24
Protein mit Bindungsfunktion oder mit Benötigung eines Kofaktors		
Protein Bindung		
160	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM01208	probable RAD6 - E2 ubiquitin-conjugating enzyme
161	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM01208	probable RAD6 - E2 ubiquitin-conjugating enzyme
Zellulärer Transport, Transport Möglichkeiten und Transport Strecken		
Transport Bestandteile (Substrate)		
106	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1014	Ctr copper transporter family
434	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1014	Ctr copper transporter family
107	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1014	related to CTR2 - Protein involved in copper transport
435	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM05980 (invalid) Alternative: UM11588	Related to copper transport protein
416	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1014	Ctr copper transporter family
417	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1014	Ctr copper transporter family
74	<i>Burkholderia pseudomallei</i> BX571966.1	Chromosome 2, complete sequence Features in this part of subject sequence: putative TonB-like transport protein
395	<i>Burkholderia pseudomallei</i> BX571966	Chromosome 2, complete sequence Features in this part of subject sequence: putative TonB-like transport protein
410	<i>Burkholderia pseudomallei</i> BX571966	Chromosome 2, complete sequence Features in this part of subject sequence: putative TonB-like transport protein
682	<i>Burkholderia pseudomallei</i> BX571966	Chromosome 2, complete sequence Features in this part of subject sequence: putative TonB-like transport protein
Zellschutz, Abwehr und Virulenz		
149	<i>Bacillus</i> sp. AM990469	Rice-C partial arsC gene for putative arsenate reductase, isolate Rice C
163	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 AB294211	ompW gene for outer membrane protein
385	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04926	PEP4-Aspartyl Protease; Peptidase A Family
475	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04926	PEP4-Aspartyl Protease; Peptidase A Family
654	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3195	Proteinase_A_fungi; Fungal Proteinase A , aspartic proteinase superfamily
620	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04926	PEP4-Aspartyl Protease; Peptidase A Family

Fortsetzung von Tabelle 10 von Seite 76		
655	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM04926	PEP4-Aspartyl Protease; Peptidase A Family
666	<i>Coprinopsis cinera okayama</i> XM_001837144	Proteinase_A_fungi; Fungal Proteinase A , aspartic proteinase superfamily
654	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3195	Proteinase_A_fungi; Fungal Proteinase A , aspartic proteinase superfamily
Komplette Genome		
13	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 CP002162	Complete genome
27	<i>Mus musculus</i> BAC clone RP23-142A14 AC122863.4	Chromosome 7, complete sequence
Nicht klassifizierte Proteine		
15a	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1981	Putative uncharacterized protein
15b	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM03660	Putative uncharacterized protein
146	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM00961	Conserved hypothetical protein
147	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM02921	Conserved hypothetical protein
656a	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1981	Putative uncharacterized protein
656b	<i>Malassezia globosa</i> MGL_1981	Putative uncharacterized protein
A155	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM00961	Conserved hypothetical protein
A157	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM00961	Conserved hypothetical protein
213	<i>Ustilago maydis</i> 521 UM00961	Conserved hypothetical protein
Ohne Ähnlichkeiten: 78, 86, 89 rev, 436 forw, 108, 121, 123, 159, 164, 436, 659, 668b, 680, A2, A3, A8, A11, A26		

Die Tabellen 11-13 zeigen die Ergebnisse der tblastx- und der blastn-Suche unter Berücksichtigung der Sequenzähnlichkeiten zu *Malassezia globosa*. Die Tabellen wurden in drei Kategorien aufgeteilt. **Kategorie 1** verdeutlicht die Sequenzen, in denen die Sequenzähnlichkeiten als besten Treffer *Malassezia globosa* ergaben. **Kategorie 2** zeigt die Sequenzen, deren Sequenzähnlichkeiten auf *Malassezia globosa* unter den 100 besten Treffern zutrafen und in **Kategorie 3** sind die Sequenzen aufgelistet, die jeweils keinen Treffer in *Malassezia globosa*, dafür aber in anderen Organismen ergaben, sowie Sequenzen, die unbekannt sind.

Tabelle 11: Kategorie 1: *Malassezia globosa* als bester Treffer in der NCBI-Datenbank nach blast-Suche (E= e-value; I=Identity; S= Similarity)

Klon Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) in <i>M. globosa</i> (Accession Nr.)	E I; S	Bester Treffer translated BLAST in anderen Organismen (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolismus						
Stickstoff, Schwefel und Selen Metabolismus						
4	MGL_3024 (XM_001729986)	7e-88 86%; 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	1e-81 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (6e-84; 76%)
77	MGL_3024 (XM_001729986)	8e-91 88%, 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	3e-84 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (6e-85; 76%)
82	MGL_3024 (XM_001729986)	2e-89 88%, 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	9e-83 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (5e-85; 76%)
84	MGL_3024 (XM_001729986)	2e-89 88%, 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	9e-83 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (5e-85; 76%)
88	MGL_3024 (XM_001729986)	2e-90 88%, 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	9e-84 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (6e-85; 76%)
103	MGL_3024 (XM_001729986)	5e-89 87%, 93%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	2e-82 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (7e-84; 76%)
5	MGL_3024 (XM_001729986)	2e-89 86%, 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	3e-83 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (6e-84; 76%)
78	MGL_3024 (XM_001729986)	3e-89 88%, 92%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	1e-82 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (6e-85; 76%)
83	MGL_3024 (XM_001729986)	4e-89 88%, 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	1e-82 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (5e-85; 76%)
89	MGL_3024 (XM_001729986)	2e-90 88%, 94%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	9e-84 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (6e-85; 76%)
104	MGL_3024 (XM_001729986)	7e-90 87%, 93%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	3e-83 83%; 94%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (7e-84; 76%)
639	MGL_3024 (XM_001729986)	8e-54 79%, 85%	<i>Ustilago maydis</i> UM05632 (XM_756686)	2e-49 78%; 87%	Iron sulfur cluster scraffold like protein	<i>Malassezia globosa</i> MGL_3024 (3e-63; 74%)
Energie						
16	MGL_2886 (XM_001729848)	1e-21 48%; 68%	<i>Ustilago maydis</i> UM01753 (XM_752807)	9e-19 54%; 71%	Galactose-induced protein of aldo/keto-reductase family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2885 (9e-12; 72%)
17	MGL_2886 (XM_001729848)	1e-21 48%; 68%	<i>Ustilago maydis</i> UM01753 (XM_752807)	1e-18 54%; 71%	Galactose-induced protein of aldo/keto-reductase family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2885 (9e-12; 72%)
506	MGL_2886 (XM_001729848)	1e-21 48%; 68%	<i>Ustilago maydis</i> UM01753 (XM_752807)	9e-19 54%; 71%	Galactose-induced protein of aldo/keto-reductase family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2885 (8e-12; 72%)
507	MGL_2886 (XM_001729848)	1e-21 48%; 68%	<i>Ustilago maydis</i> UM01753 (XM_752807)	1e-18 54%; 71%	Galactose-induced protein of aldo/keto-reductase family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2885 (9e-12; 72%)
657	MGL_2886 (XM_001729848)	6e-21 48%; 66%	<i>Ustilago maydis</i> UM01753 (XM_752807)	4e-17 51%; 68%	Galactose-induced protein of aldo/keto-reductase family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2885 (9e-12; 72%)
658	MGL_2886 (XM_001729848)	1e-21 48%; 68%	<i>Ustilago maydis</i> UM01753 (XM_752807)	1e-18 54%; 71%	Galactose-induced protein of aldo/keto-reductase family	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2885 (9e-12; 72%)
Protein Synthese						
198b	MGL_2586 (XM_001730152)	7e-19 69%;83%	<i>Ustilago maydis</i> UM00942 (XM_751996)	5e-15 67%; 90%	Ribosomal protein L24e, L24	<i>Malassezia globosa</i> MGL_2885 (2e-28; 71%)

Fortsetzung von Tabelle 11 von Seite 78						
Zellulärer Transport, Transport Möglichkeiten und Transport Strecken						
106	MGL_1014 (XM_001731694)	3e-29 52%; 70%	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 (XM_656325)	1e-16 52%; 70%	Ctr, copper transporter family	<i>Hottentotta judaicus</i> (0,23; 100%)
434	MGL_1014 (XM_001731694)	4e-29 52%; 70%	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 (XM_656325)	1e-16 52%; 70%	Ctr, copper transporter family	<i>Hottentotta judaicus</i> (0,068; 100%)
107	MGL_1014 (XM_001731694)	2e-28 52%; 70%	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 (XM_656325)	2e-16 52%; 70%	Ctr, copper transporter family	<i>Lolium multiflorum purple acid phosphatase (PAP1)</i> (0,023; 100%)
435	MGL_1014 (XM_001731694)	4e-29 52%; 70%	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 (XM_656325)	1e-16 52%; 70%	Ctr, copper transporter family	<i>Anguilla japonica SLC26A6</i> (9e-07; 93%)
416	MGL_1014 (XM_001731694)	4e-06 58%; 77%	<i>Streptomyces coelicolor A3</i> (AL939110)	0,15 44%; 50%	Ctr, copper transporter family	<i>Alexandrium tamarense</i> (4e-16; 97%)
417	MGL_1014 (XM_001731694)	2e-05 58%; 74%	<i>Phage f1 gene IV/II</i> (M10641)	1e-16 52%; 70%	Ctr, copper transporter family	<i>Bacteriophage f1</i> (3e-18; 76%)
Nicht klassifizierte Proteine						
15a	MGL_1981 (XM_001730930)	6e-61 67%; 83%	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (XM_754714)	6e-55 69%; 79%	Putative uncharacterized protein	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (1e-46; 74%)
15b	MGL_1981 (XM_001730930)	1e-55 67%; 81%	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (XM_754714)	8e-55 73%; 83%	Putative uncharacterized protein	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (1e-46; 74%)
146	MGL_0288 (XM_001732461)	3e-19 56%; 73%	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (XM_752015)	3e-34 74%; 84%	Conserved hypothetical protein	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (1e-28; 71%)
147	MGL_0288 (XM_001732461)	4e-19 56%; 73%	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (XM_752015)	4e-34 74%; 84%	Conserved hypothetical protein	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (1e-28; 71%)
656a	MGL_1981 (XM_001730930)	1e-60 67%; 82%	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (XM_754714)	1e-54 69%; 79%	Putative uncharacterized protein	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (1e-46; 74%)
656b	MGL_1981 (XM_001730930)	1e-60 67%; 83%	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (XM_754714)	1e-54 69%; 79%	Putative uncharacterized protein	<i>Ustilago maydis</i> UM03660 (2e-46; 74%)
A155	MGL_0228 (XM_001732461)	4e-19 56%; 73%	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (XM_752015)	5e-34 74%; 84%	Conserved hypothetical protein	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (1e-28; 71%)
A157	MGL_0228 (XM_001732461)	3e-19 56%; 73%	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (XM_752015)	2e-34 74%; 84%	Conserved hypothetical protein	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (1e-28; 71%)
213	MGL_0228 (XM_001732461)	3e-19 56%; 73%	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (XM_752015)	3e-33 72%; 82%	Conserved hypothetical protein	<i>Ustilago maydis</i> UM00961 (2e-27; 71%)

Tabelle 12: Kategorie 2: *Malassezia globosa* unter den 100 besten Treffern, aber nicht als bester Treffer in der NCBI-Datenbank nach blast-Suche (E= e-value, I=Identity, S= Similarity)

Klon Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) (Accession Nr.)	E I; S	Bester Treffer translated BLAST in <i>M. globosa</i> Accession Nr.	E I; S	Bester Treffer translated BLAST in <i>Ustilago maydis</i> (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolismus von Vitaminen, Kofaktoren und Prothetischen Gruppen								
508	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	2e-28 85%; 94%	MGL_3683 XM_001729164	0,063 25%; 37%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	4e-26 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (6e-38;78%)
347	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	1e-28 85%; 94%	MGL_3178 XM_001729582	0,35 46%; 54%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	2e-26 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (2e-36;77%)
428	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	2e-28 85%; 94%	MGL_3683 XM_001729164	0,047 25%; 37%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	2e-26 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (4e-38;78%)
499	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	2e-28 85%; 94%	MGL_3683 XM_001729164	0,060 25%; 37%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	3e-26 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (5e-38;78%)
584	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	2e-28 85%; 94%	MGL_1607 XM_001731372	0,48 36%; 36%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	9e-27 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (6e-38;78%)
660	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	2e-28 85%; 94%	MGL_3683 XM_001729164	0,063 25%; 37%	<i>Ustilago maydis</i> X UM04081 M_755135	4e-26 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (5e-38;78%)
25	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	2e-28 85%; 94%	MGL_1607 XM_001731372	0,44 36%; 36%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	8e-27 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (6e-38;78%)
73	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	2e-28 85%; 94%	MGL_3683 XM_001729164	0,068 25%; 37%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	4e-26 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (6e-38;78%)
94	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53 (CP000463)	3e-07 73%; 85%	MGL_0496 XM_001732669	1,8 48%; 64%	<i>Ustilago maydis</i> UM04081 XM_755135	7e-09 67%; 79%	Glutathione-S-Transferase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1 (1e-25;73%)
Zellschutz, Abwehr und Virulenz								
385	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama 7#130 (XM_001837144)	2e-42 71%; 80%	MGL_3195 XM_001729599	3e-42 66%; 81%	<i>Ustilago maydis</i> UM04926 XM_755980	1e-42 62%; 74%	PEP4-Aspartyl Protease; Peptidase A family	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama 7#130 (3e-31;72%)

Fortsetzung von Tabelle 12 von Seite 80								
475	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (XM_001837144)	1e-42 71%; 80%	MGL_3195 XM_001729599	2e-42 66%; 81%	<i>Ustilago maydis</i> UM04926 XM_755980	9e-43 66%; 78%	PEP4- Aspartyl Protease; Peptidase A Family	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (2e-31; 72%)
654	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (XM_001837144)	7e-42 70%; 78%	MGL_3195 XM_001729599	2e-41 65%; 79%	<i>Ustilago maydis</i> UM04926 XM_755980	5e-42 65%; 77%	PEP4- Aspartyl Protease; Peptidase A Family	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (1e-28;71%)
620	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (XM_001837144)	1e-40 70%; 78%	MGL_3195 XM_001729599	4e-40 65%; 80%	<i>Ustilago maydis</i> UM04926 XM_755980	8e-41 65%; 77%	PEP4- Aspartyl Protease; Peptidase A Family	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (5e-27;71%)
655	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (XM_001837144)	7e-42 70%; 78%	MGL_3195 XM_001729599	2e-41 65%; 79%	<i>Ustilago maydis</i> UM04926 XM_755980	5e-42 65%; 77%	PEP4- Aspartyl Protease; Peptidase A Family	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (1e-28;71%)
666	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (XM_001837144)	8e-40 69%; 78%	MGL_3195 XM_001729599	2e-39 64%; 80%	<i>Ustilago maydis</i> UM04926 XM_755980	1e-39 64%; 76%	PEP4- Aspartyl Protease; Peptidase A Family	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (3e-30;71%)
654b	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (XM_001837144)	8e-40 69%; 78%	MGL_3195 XM_001729599	3e-42 62%; 75%	<i>Ustilago maydis</i> UM04926 XM_755980	7e-43 66%; 78%	PEP4- Aspartyl Protease; Peptidase A Family	<i>Coprinopsis cinerea</i> <i>okayama</i> 7#130 (7e-30;71%)

Tabelle 13: Kategorie 3: Kein Treffer für *Malassezia globosa* in der NCBI-Datenbank nach blast-Suche (E= e-value, I= Identity, S= Similarity)

Klon Nr.	Bester Treffer translated BLAST (tblastx) (Accession Nr.)	E I; S	Hypothetische Funktion	Bester Treffer nucleotide BLAST (blastn) (E; I)
Metabolismus				
Metabolismus anderer Organismen				
212	<i>Pseudomonas putida F1, complete genome</i> (CP000712)	6e-19 (72%); (87%)	Features in this part of sequence: Cyanate lyase	<i>Ensis arcuatus microsatellite DNA</i> (2e-34; 72%)
160	<i>Ustilago maydis 521 UM01208</i> (XM_752262)	8e-34 (92%); (100%)	Propable RAD6- E2 ubiquitin conjugating enzyme	<i>Laccaria bicolor S238N-H82</i> (7e-32; 80%)
161	<i>Ustilago maydis 521 UM01208</i> (XM_752262)	6e-34 (92%); (100%)	Propable RAD6- E2 ubiquitin conjugating enzyme	<i>Laccaria bicolor S238N-H82</i> (7e-32; 80%)
74	<i>Burkholderia pseudomallei strain K96243</i> (BX571966)	0,22 (46%); (59%)	Putative TonB-like transport protein	<i>Artificial vector pJL541</i> (1e-19, 77%)
395	<i>Burkholderia pseudomallei strain K96243</i> (BX571966)	0,079 (46%); (59%)	Putative TonB-like transport protein	<i>Plasmodium knowlesi strain H</i> (4e-08,93%)
410	<i>Burkholderia pseudomallei strain K96243</i> (BX571966)	0,043 (46%); (59%)	Putative TonB-like transport protein	<i>Plasmodium knowlesi strain H</i> (3e-08,98%)
682	<i>Burkholderia pseudomallei strain K96243</i> (BX571966)	0,075 (46%); (59%)	Putative TonB-like transport protein	<i>Plasmodium knowlesi strain H</i> (1e-08,100%)
Zellzyklus and DNA-Entwicklung				
2	<i>Homo sapiens cDNA FLJ16261</i> (AK131298)	0,16 (32%); (49%)	mTERF domain-containing protein 2	<i>Hottentotta judaicus Hj0016 gamma(m)-buthitoxin-Hj1c pseudogene</i> (7e-10; 88%)
10	<i>Platanus x acerfolia AM397241</i>	1e-08 (74%);(77%)	Putative Ty-copia reverse transcriptase (RT-Gene) and partial DfRedu pseudogene	<i>Artificial vector pJL531, complete sequence</i> (2e-24; 87%)
422	<i>Platanus x acerfolia AM397241</i>	2e-08 (100%);(100%)	Putative Ty-copia reverse transcriptase (RT-Gene) and partial DfRedu pseudogene	<i>Artificial vector pJL531, complete sequence</i> (1e-33; 100%)
Zellschutz, Abwehr und Virulenz				
149	<i>Bacillus sp.</i> (AM990469)	9e-11 (100%); (100%)	Rice-C partial arsC gene for putative arsenate reductase, isolate Rice C	<i>Uncultured Methylobacterium sp.</i> (5e-29, 100%)
163	<i>Escherichia coli O157:H7</i> (AB294211)	8e-13 (96%); (96%)	ompW gne for outer membrane protein	<i>Citrobacter freundii isolate CF-4 class</i> (9e-33, 100%)
Komplettes Genom				
13	<i>Micromonospora sp., complete genome</i> (CP002162)	1,1 (36%); (53%)	WGR domain containing protein	No significant similarity
27	<i>Mus musculus BAC clone RP23-142A14</i> (AC122863)	0,018 (46%); (54%)	From chromosome 7, complete sequence	No significant similarity
Ohne Ähnlichkeiten: 78, 86, 89 rev, 436 forw, 108, 121, 123, 159, 164, 659, 668, 680, A2, A3, A8, A11, A26,				

Die geblasteten Sequenzen wurden im weiteren Verlauf nach den größten Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus *Malassezia globosa*, *Ustilago maydis*, anderen Organismen und unbekannten Sequenzen eingeteilt. Die Ergebnisse dieser Einteilung sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt. Aus der oberen Abbildung sind die Ergebnisse der tblastx-Suche und auf der unteren Abbildung die Ergebnisse der blastn-Nukleotid-Suche zu sehen. Beim Vergleich der beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass bei der tblastx-Suche *Malassezia globosa* als bester Treffer

vorherrscht, während sich dies bei der blastn-Suche auf die Kategorie „andere Organismen“ zutrifft. *Ustilago maydis* als bester Treffer fällt in der tblastx-Suche geringer aus als bei der blastn-Suche. Umgekehrt verhält es sich bei der Kategorie „Keine Ähnlichkeiten“. Hier fallen die Ergebnisse des besten Treffers in der Abb. 18 stärker aus als in Abb. 19. Zusammenfassend kann man sagen, dass *Malassezia globosa* und die Kategorie „andere Organismen“ in beiden Abbildungen insgesamt als Ergebnis dominiert, während die Ergebnisse für „*Ustilago maydis*“ und „Keine Ähnlichkeiten“ eher schwach ausfallen.

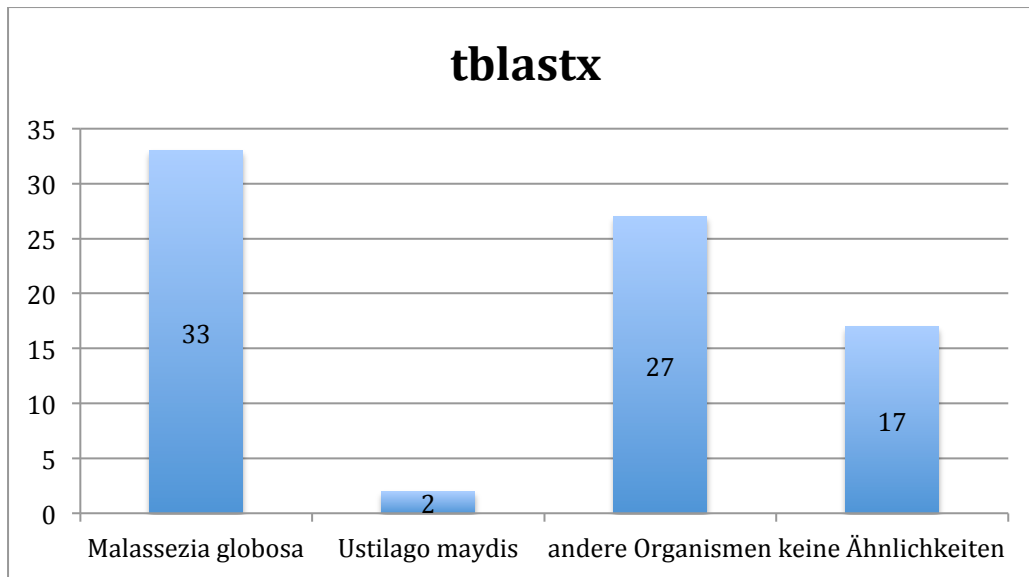


Abbildung 18: Verteilung der translated-blast Ergebnisse (tblastx) der 61 erfolgreich sequenzierten Sequenzen

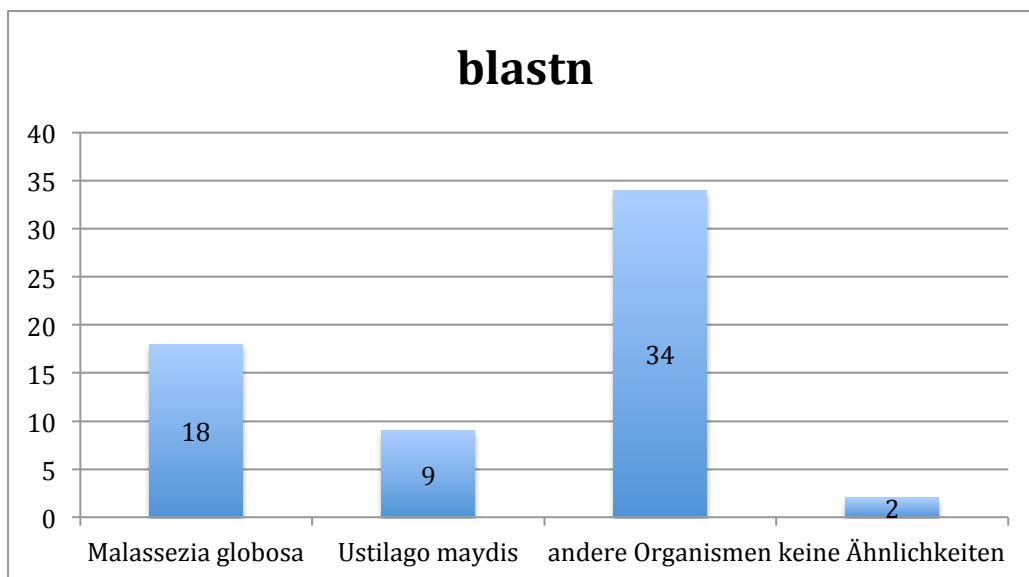


Abbildung 19: Verteilung der Nukleotid-blast Ergebnisse (blastn) der 61 erfolgreich sequenzierten Sequenzen

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden die Sequenzen mit Hilfe des Seqman-Programmes anhand ihrer Sequenzüberschneidungen in unterschiedliche Contigs eingeteilt. Insgesamt konnten 16 verschiedene Contigs unterschieden werden. Davon bestanden 3 Contigs aus nur jeweils einer Sequenz. Die restlichen Contigs enthielten zwischen 2 und 16 Sequenzen. Tabelle 14 zeigt die Einteilung der

Sequenzen in die unterschiedlichen Contigs. Des Weiteren sind in der Tabelle die Organismen als bester Treffer, die blast-Ergebnisse der Einzelsequenzen sowie der tblastx-Suche der abgeglichenen Gesamtsequenzen aufgelistet. Sowohl die jeweiligen blast-Ergebnisse der Einzelsequenzen wurden miteinander verglichen als auch die Gesamtsequenzen gegeneinander geblastet. Die Tabelle ist nach der Reihenfolge der Contigs geordnet.

Tabelle 14: Einteilung der Sequenzüberschneidungen in unterschiedliche Contigs

Contig	Sequenzen	Bester Treffer	Blast Ergebnis der Einzelsequenzen	Blast Ergebnis der Gesamtsequenzen
1	434, 435, 106, 1067	<i>Malassezia globosa</i> , <i>Ustilago maydis</i>	Ctr copper transporter family	Ctr copper transporter family
2	4, 5, 77, 78, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 103, 104, 639	<i>Malassezia globosa</i> , <i>Ustilago maydis</i>	ISU1 Iron-Sulfur cluster nifU-like Protein	FeS cluster assembly scaffold IscU
3	422, 108	422a: <i>Platanus x acerifolia</i> 108a/b: no similarity	422a: Ty 1-copia reverse transcriptase and partial DfRedu pseudogene 108a/b: no similarity	<i>Platanus x acerifolia</i> mRNA for partial putative Ty1-copia reverse transcriptase (RT gene) and partial DfRedu pseudogene
4	146, 147, A155, A157, 213	<i>Malassezia globosa</i> , <i>Ustilago maydis</i>	Conserved hypothetical protein	Conserved hypothetical protein
5	160, 161	<i>Ustilago maydis</i>	E2 Ubiquitin conjugating enzyme	UBCc; Ubiquitin-conjugating enzyme E2
6	2, 13, 27, 74, 395, 410, 668b, 682	2: <i>Homo sapiens</i> cDNA 13: <i>Micromonospora aurantica</i> 27: <i>Mus musculus</i> BAC clone 74/395/410/682: <i>Burkholderia pseudomallei</i> 668b: no similarity	2: mTERF domain-containing protein2 13: complete genome 27: chromosome 7 74/395/410/682: TonB like Transport protein 668b: no similarity	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> similar to spicule matrix protein SM29 (LOC576423), mRNA
7	25, 73, 94, 347, 428, 499, 508, 584, 660	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> , <i>Ustilago maydis</i>	Glutathione-S-Transferase	Glutathione S-transferase
8	16, 17, 506, 507, 657, 658	<i>Ustilago maydis</i> , <i>Malassezia globosa</i>	GCY1-galactose-induced protein of aldo/keto-reductase family (AKRs)	Aldo-keto-reductases (AKRs)
9	385, 475, 620, 654, 655, 666	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama, <i>Ustilago maydis</i> , <i>Malassezia globosa</i>	PEP4-Aspartyl Protease, Peptidase A family	<i>Drosophila melanogaster</i> (P1 DS04892 (D66)) DNA sequence
10	416, 417	<i>Malassezia globosa</i> , <i>Ustilago maydis</i>	Ctr copper transporter	Ctr copper transporter
11	198	<i>Malassezia globosa</i> <i>Ustilago maydis</i>	Ribosomal protein L24e L24	Ribosomal protein L24e L24
12	212	<i>Pseudomonas putida</i>	Cyanate lyase	Cyanate lyase
13	15a, 15b, 656a, 656b	<i>Malassezia globosa</i> , <i>Ustilago maydis</i>	Putative uncharacterized protein	Putative uncharacterized protein
14	436	-	No significant similarity	No significant similarity
15	10, 74	10: <i>Platanus x acerifolia</i> 74: <i>Burkholderia pseudomallei</i>	10: Ty1-copia reverse transcriptase and partial DfRedu pseudogene 74: TonB-like transport protein	<i>Platanus x acerifolia</i> mRNA for partial putative Ty1-copia reverse transcriptase (RT gene) and partial DfRedu pseudogene
16	78, 86, 89b, 108, 121, 123, 159, 164, 659, 668, 680, A2, A3, A8, A11, A26	-	No significant similarity	No significant similarity

Bei der Auswertung fiel auf, dass sich die Einteilung der Sequenzen in die verschiedenen Contigs teilweise von der Einteilung der Sequenzen aus der blast-Suche unterschieden. Das ist zum Beispiel bei den Contigs 3, 6 und 15 der Fall. Die Zugehörigkeit zu einem Contig zeigt, dass Sequenzüberschneidungen vorhanden sind,

allerdings kommt es trotzdem zu unterschiedlichen blast-Ergebnissen der Einzelsequenzen. Weiterhin fällt auf, dass bei den Contigs 6 und 9 die Einzelsequenzen ein anderes Ergebnis bei der blast-Suche liefern als die blast-Suche der Gesamtsequenzen.

4.2.7 Funktionelle Einteilung der Sequenzen

Die erfolgreich sequenzierten, geblasteten und analysierten Sequenzen wurden mit Hilfe des MIPS-Yeast Funcat (Mewes et al., 2002; Ruepp et al., 2004) nach ihren wahrscheinlichen funktionellen Aspekten geordnet. Abbildung 20 stellt diese Einteilung nach Funktionen dar. Die Einteilung der verschiedenen Stoffwechselfunktionen wurde ohne eine weitere Unterteilung in Unterfunktionen vorgenommen (siehe Metabolismus). Insgesamt konnten die Sequenzen in 10 verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Stoffwechselfunktionen in gleicher Reihenfolge wie in Tabelle 10 aufgeführt. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der zugehörigen Sequenzen der jeweils aufgeführten Stoffwechselfunktionen. Am stärksten sind Sequenzen aus dem Bereich Metabolismus vertreten. Am zweitstärksten die Sequenzen für die es keine Übereinstimmungen in der NCBI-Datenbank gab. Zu fast gleichen Teilen sind die Sequenzen vertreten, die zur funktionellen Gruppe des zellulären Transports, der Zellulären Abwehr und der noch nicht klassifizierten Proteine gehören. Den kleinsten Anteil nehmen die Sequenzen mit den Funktionen Energie, Zellzyklus und DNA-Entwicklung, Protein-Bindung und die der kompletten Genomsequenzen ein.

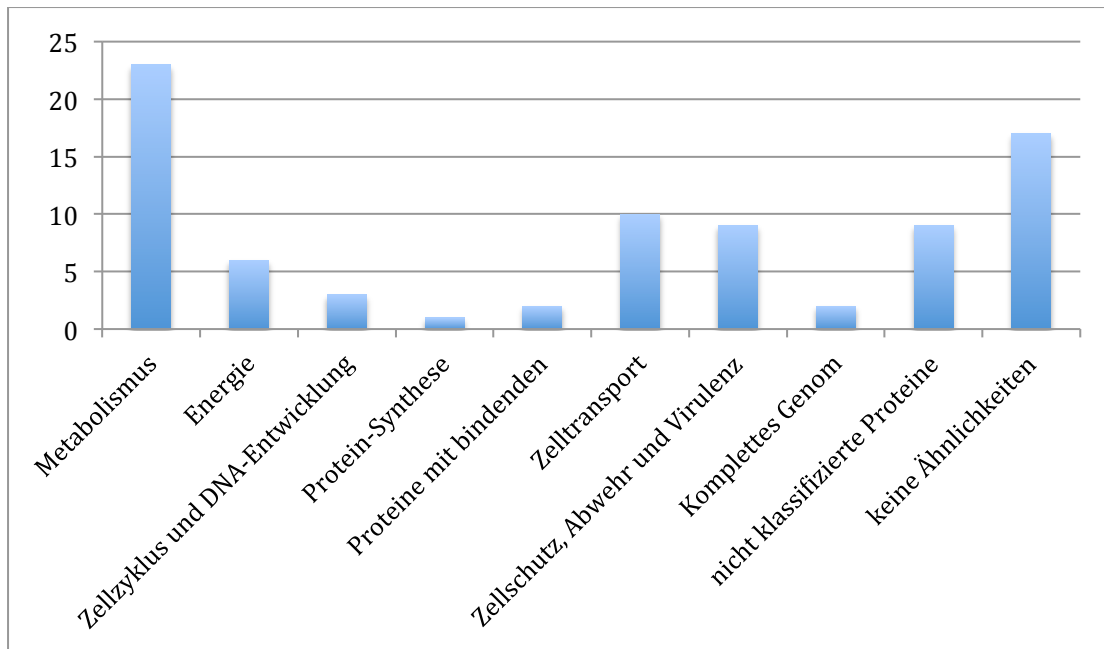


Abbildung 20: Funktionelle Einteilung der Sequenzen in Anlehnung an der MIPS-Yeast Funcat (Ruepp et al., 2004; Mewes et al., 2002)

4.2.8 Einordnung der gefundenen Gene zu Funktionen und in hyphenassoziierte Stoffwechselwege

Es wurde überprüft, welche Enzyme und damit welche gefundenen Gene bei der Hyphenbildung von *Malassezia furfur* eine Rolle spielen könnten. Es konnten mit Hilfe des cDNA-Subtraktionsverfahrens insgesamt 14 Proteine identifiziert werden. Eines von ihnen weist Ähnlichkeiten zu einem Protein auf, das bei der Hyphenbildung von *Malassezia furfur* eine Rolle spielen könnte. Es handelt sich bei diesem Protein um eine PEP4-Aspartyl-Protease (Sequenzen 385, 475, 654, 620, 655, 666). Die PEP4-Aspartyl-Protease ist ein proteolytisches Enzym, welches in unterschiedlichen Organismen vorkommt und zur Asparagin-Proteinase-Superfamilie gehört. Die PEP4-Aspartyl-Protease spielt bei der Hyphenbildung in *Ustilago maydis* eine entscheidende Rolle (Böhmer et al., 2007). Böhmer et al. identifizierten mehr als 250 Proteine, indem sie 2-DE Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit MALDI-TOF-MS und ESI-MS/MS Analysen kombinierten. Sie konnten dadurch eine Referenzkarte des Proteoms von *Ustilago maydis* erstellen. In diesem Zusammenhang konnten sie die Fülle an cytosolischen Proteinen in filamentösen Zellen bestimmen und sie mit Zellen, die sich in Knospung befanden, vergleichen.

Das Hyphenwachstum wurde durch Überexpression des bw2/bE1-Heterodimers, oder durch Überexpression des GTP bindenden Proteins Rac1 induziert. Sie verglichen die beiden Expressionsprofile und konnten 13 Proteinspots identifizieren, die während des filamentösen Wachstums gesteigert und durch bw2/bE1 induziert wurden (Böhmer et al., 2007). Abbildung 21 zeigt einen Stoffwechselweg der Hypheninduktion in *Ustilago maydis*, der durchaus auch einen möglichen Modellstoffwechselweg für die Hyphenbildung in *Malassezia furfur* darstellen könnte. Aufgeführt sind die Proteine, die bei der Hyphenbildung eine entscheidende Rolle spielen. Eines der Schlüsselenzyme ist die PEP4-Aspartyl-Protease aus Contig Nr. 9 des cDNA-Subtraktionsverfahrens. Da die PEP4-Aspartyl-Protease nachweislich eine wichtige Rolle in der Hyphenbildung von *Ustilago maydis* spielt und sich deutliche Homologien zu Contig Nr. 9 zeigen (UM04926), kann man derartige Schlüsse auch für *Malassezia furfur* treffen. Für *Malassezia globosa* wurde im Zusammenhang mit der PEP4-Aspartyl-Protease kein bekannter Modellstoffwechselweg in der Literatur gefunden, der die Hyphenbildung erklärt und den man auf *Malassezia furfur* übertragen könnte. Thomas L. Dawson Jr. hat 2007 das *Malassezia-globosa*- und *Malassezia-restricta*-Genom sequenziert und dabei die Aspartyl-Protease neben anderen Proteinen unter den am meisten sezernierten Proteinen gefunden. Die am meisten ausgeschütteten Proteine agieren demnach am stärksten mit der Haut und stehen somit höchstwahrscheinlich mit der Pathogenität von *Malassezia globosa* in Zusammenhang (Dawson, 2007; Xu et al., 2007). Böhmer et al. (2007) identifizierten neben der PEP4-Aspartyl-Protease auch das GCY1-Protein, ein Galaktose-induziertes Protein der Aldo-Keto-Reduktase-Familie (UM11944) und die Aldo-Keto-Reduktase-YakC (UM03006). Dieses Protein zeigte sich wie die PEP4-Aspartyl-Protease anhand von Protein-Spots mit erhöhter Intensität nach dem Übergang der Zellen in die Hyphenform. Unter den differentiell exprimierten Sequenzen des cDNA-Subtraktionsverfahrens dieser Arbeit findet sich auch ein GCY1-Protein. Es wird durch die Sequenzen 16, 17, 506, 507, 657 und 658 repräsentiert und bildet das Contig Nr. 8 (UM01753).

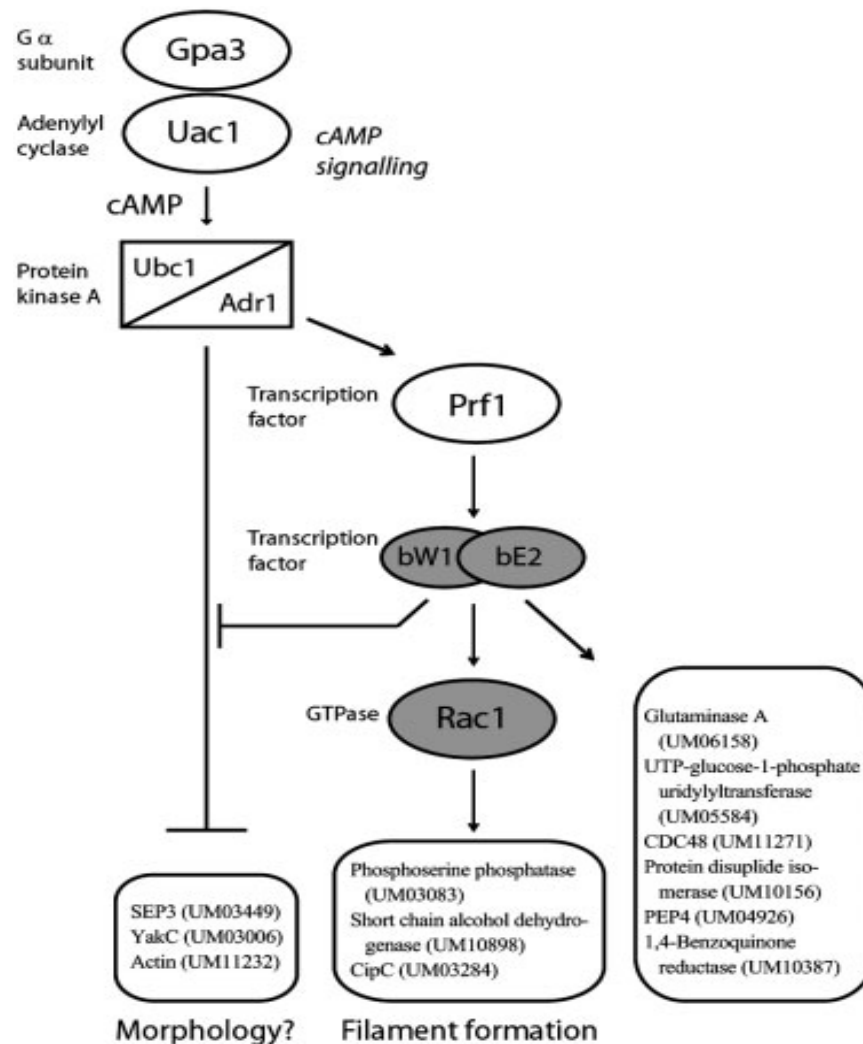


Abbildung 21: Modellstoffwechselweg der Hyphenbildung in *Ustilago maydis* (Böhmer et al., 2007)

In der Literatur fanden sich keine Angaben zu GCY1 in *Malassezia globosa* oder *Ustilago maydis* und dessen möglicher Funktion im Stoffwechsel. In *Saccharomyces cerevesiae* besitzt das Hefe-Protein katalytische und Co-Substrat-bindende Reste und zeigt eine NADPH-spezifische Reduktase-Aktivität. Die katalytischen Eigenschaften unterscheiden sich allerdings von anderen Aldo-Keto-Reduktasen. Es ist noch nicht bekannt, warum das Enzym diesen unkonventionellen katalytischen Mechanismus entwickelt hat und welche Auswirkungen es auf die Substratbindung und andere enzymatische Eigenschaften hat (Hur und Wilson, 2001).

Andere Sequenzen zeigten im tblastx Ähnlichkeiten zu Proteinen des Primärmetabolismus, die an der Bindung von Eisen und Eisen-Schwefel-Clustern, sowie am Einbau von Eisen und exogenem Schwefel in einen Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt sind (Klon Nr. 4, 5, 77, 78, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 103, 104, 639).

Weitere Sequenzen, die Ähnlichkeit zu einem Protein des Primärstoffwechsels haben, zeigen Homologien zu einer Glutathione-S-Transferase (Klon Nr. 25, 73, 94, 347, 428, 499, 508, 584, 660). Glutathione-S-Transferasen katalysieren den Transfer des Tripeptid Glutathion zu einem Co-Substrat mit einem reaktiven elektrophilen Zentrum, um ein polares S-glutathionyliertes Reaktionsprodukt zu bilden. Weitere Homologien fanden sich zu Gensequenzen aus dem Bereich der Protein-Bindung für ein E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Klon Nr. 160, 161) und für ein Ctr-Kupfer-Transport-Protein aus dem funktionellen Bereich Zell-Transport (Klon Nr. 74, 106, 107, 395, 410, 416, 417, 434, 435,, 682). Die Ubiquitinylierung ist ein ATP-abhängiger Prozess, der eine Kaskade von mindestens drei Enzymen beinhaltet. Das E1-Enzym vermittelt eine ATP-abhängige Übertragung von einem Thioester-gebundenen Ubiquitin-Molekül auf einen Cysteinrest des E2-Enzyms. Das E2-Enzym überträgt dann wiederum die Ubiquitin-Einheit direkt auf ein Substrat oder auf eine E3-Ligase. Die Homologien der gefundenen Sequenzen 74-682 (s.o.) lassen auf ein Kupfer-Transport-Protein schließen. Dieses durchdringt mindestens eine Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran. Kupfer ist in diesem Zusammenhang ein wichtiger Cofaktor bei unterschiedlichen biologischen Prozessen wie Atmung, Eisentransport, oxidativem Stress, Schutz- und Hormon-Produktion sowie bei der Pigmentierung. Die Ctr-Kupfer-Transportproteine vermitteln die Aufnahme von Kupfer an der Plasmamembran. Jedoch konnten weder die Stoffwechselwege des Ubiquitin-konjugierenden-Enzyms, noch die des Kupfer-Transports mit der Hyphenbildung in Verbindung gebracht werden.

Weitere Sequenzen zeigten im tblastx Ähnlichkeiten zu einer Cyanate Lyase (Sequenz Nr. 212; Stickstoffstoffwechsel), einem mTERF domain-containing protein 2 (Sequenz Nr. 2; bindet DNA als Monomer), einer Reversen Transkriptase (Sequenzen Nr. 10, 422), einem ribosomalen Protein L24 (Sequenz: 198; Translation bei Eukaryoten), einem TonB-like Transport-Protein (Sequenzen: 74, 395, 410, 682; Zelltransport), einem Gen für eine Arsenate-Reduktase (Sequenz: 149) und einem äußeren Membranprotein (163). Des weiteren fanden sich Ähnlichkeiten zu kompletten Genomsequenzen (Sequenzen 13, 27) und einem Protein, dass bisher weder für *Malassezia globosa* noch für *Ustilago maydis* genauer charakterisiert werden konnte (Sequenzen Nr. 15a, 15b, 146, 147, 656a, 656b, A155, A157, 213).

5 Diskussion

Die Pityriasis versicolor wird durch *Malassezia*-Hefen verursacht, insbesondere in den gemäßigten Breiten durch *Malassezia globosa* (Dawson, 2007; Xu et al., 2007) und durch *Malassezia furfur* vermehrt in den tropische Klimazonen (Aspiroz et al., 2002; Crespo Erchiga et al., 2000; Gaitanis et al., 2006; Karakaş et al., 2009; Tarazooie et al., 2004). Auch *Malassezia sympodialis* wurde bereits als möglicher Erreger diskutiert (Dutta et al., 2002; Krisanty et al., 2008; Miranda et al., 2006). Die Pathogenese der Pityriasis versicolor ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und wirft immer wieder neue Fragen auf. Die Diagnose der PV wird klinisch und anhand des Nachweises von Sproßzellen und Hyphen („Spaghetti und Fleischklößchen“) im Nativpräparat aus Schuppen befallener Hautbezirke gestellt. Da Hyphen weitaus häufiger (zu 100%) auf erkrankter Haut (Gupta et al., 2001) auftreten als auf gesunder (6-7%) (McGinley et al., 1970), geht man davon aus, dass die Hyphenbildung eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der PV spielt und die Hyphen selbst einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellen. In der Vergangenheit wurde bereits häufiger versucht, eine Hyphenbildung *in vitro* bei den verschiedenen *Malassezia*-Spezies zu induzieren (McGinley et al., 1975), was teilweise auch erfolgreich gelang. Die Ergebnisse konnten allerdings nicht für alle *Malassezia*-Spezies erreicht werden und waren meist an komplexe Kulturbedingungen gebunden. Mayser et al. (1998a) gelang es bei *Malassezia furfur*, eine Hyphenbildung zu induzieren, indem er Glycin als einzige Stickstoffquelle zu einem Minimalnährmedium zufügte (Dorn und Roehnert, 1977; Faergemann und Bernander, 1981; Faergemann et al., 1983a; Nazarro-Porro et al., 1977). Es ist zu diesem Zeitpunkt also zum ersten Mal gelungen, die Hyphenbildung durch eine bestimmte Substanz zu induzieren, ohne dabei auf komplexe Zusatzstoffe im Medium zurückgreifen zu müssen, die eventuell die Ergebnisse verfälschen könnten. Anschließend sind keine weiteren Versuche zur Hypheninduktion bei *Malassezia furfur in vitro* bekannt geworden. Hinzu kommt, dass *Malassezia furfur* bisher auch nur wenig molekularbiologisch untersucht wurde. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen speziell zur Hyphenbildung bei *Malasszia furfur* unter den eingangs gestellten Fragestellungen durchgeführt und es wurde versucht, einen besseren Einblick in die noch nicht eindeutig aufgeklärte Pathogenese der Pityriasis versicolor zu bekommen. Ziel dieser Arbeit war es eine Erfassung und Identifizierung von

Genen zu ermöglichen, die an der Hyphenbildung von *Malassezia furfur* beteiligt sind. Ein weiteres Ziel war es, Nährmedien zu etablieren, die *in vitro* bei dieser Hefe eine Hyphenbildung induzieren können.

In ersten Voruntersuchungen wurde versucht, eine Hyphenbildung bei unterschiedlichen *Malassezia*-Spezies unter verschiedenen, teilweise bereits auch in der Literatur beschriebenen Bedingungen *in vitro* auszulösen. Wichtig war hierbei, mit einem Minimalnährmedium zu arbeiten, um eventuelle kulturbedingte Fehlerquellen auszuschließen und eine erfolgreiche Hyphenbildung direkt auf die unterschiedlichen Bedingungen zurückführen zu können. Aufgrund dessen, dass mit der Aminosäure Glycin die meisten Erfolge zur Hyphenbildung in der Vergangenheit verbucht werden konnten, wurde sie als Mittel der Wahl für alle folgenden Versuche ausgewählt (Mayser et al., 1998a). Hierdurch war es möglich, bei *Malassezia furfur* 7019, 1878, S313, 6094 auf festem 1b-Glycin-Hypheninduktionsmedium Hyphenbildung zu induzieren. Bei *Malassezia furfur* 7019 war es möglich, auch in flüssigem 1b-Minimalnährmedium unter Zugabe von Glycin als einziger Stickstoffquelle eine Hyphenbildung zu auszulösen. Bei allen anderen untersuchten Spezies konnte mit diesem Nährmedium keine Hyphenbildung festgestellt werden. *Malassezia furfur* ist als einzige Spezies in der Lage, unter Zugabe von Glycin, Hyphen auszubilden und zu wachsen (Dorn und Roehnert, 1977; Mayser et al., 1998a; Saadatzaheh et al., 2001b). Eine Sonderstellung in diesem Zusammenhang fiel *Malassezia globosa* zu, da diese Spezies überhaupt nicht unter diesen *in-vitro*-Bedingungen zu einem Wachstum, geschweige denn zu einer Hyphenbildung veranlasst werden konnte. Die anderen *Malassezia*-Spezies wuchsen unterschiedlich gut, es konnte jedoch bei keiner eine Hyphenbildung beobachtet werden. Es wurde von den verschiedenen *Malassezia*-Spezies jeweils nur ein Stamm getestet, da speziesspezifische Kulturbedingungen und –ergebnisse mit Gültigkeit für die gesamte Spezies und nicht nur für die einzelnen Stämme erarbeitet werden sollten. Bei *Malassezia sympodialis* konnte unter diesen Versuchsbedingungen keine Hyphenbildung induziert werden, obwohl dies in der Vergangenheit auf einem anderen Medium bereits gelungen war (Faergemann und Bernander, 1981). Dieser Versuch diente lediglich als Überblick, welche anderen *Malassezia*-Spezies auf diesem Medium zur Hyphenbildung fähig sind. Aufgrund dieser Umstände wurde *Malassezia furfur* 7019 als Versuchsorganismus für die weiteren *in-vitro*-Versuche

gewählt. Diese Spezies ist sehr anspruchslos und benötigt außer einer Lipid- und einer Amino-Stickstoffquelle keine weiteren Vitamine, Elektrolyte oder Spurenelemente (Mayser et al., 1998a) und ist daher bestens geeignet für *in-vitro*-Versuche auf einem Mangelnährmedium. Hinzu kommt, dass *Malassezia furfur* in tropischen Klimazonen auch als Erreger der PV diskutiert wird und man dadurch die gewonnenen Erkenntnisse gut auf *Malassezia globosa* übertragen kann. Interessant wäre gewesen, die gleichen Versuche mit *Malassezia globosa* durchzuführen und hinterher die Versuche mit denen aus *M. furfur* zu vergleichen. Hierfür müsste allerdings zuerst ein geeignetes Hypheninduktionsmedium für *Malassezia globosa* gefunden werden, welches zudem ein gutes Wachstum des Pilzes garantiert. Laut den Untersuchungen von Faergemann und Bernander von 1981 bilden *P. orbiculare* (vermutlich ist das heute *Malassezia globosa*) und *P. ovale* (vermutlich ist das heute *Malassezia furfur*) am besten kurze Filamente unter mikroaeroben Bedingungen und auf einem Medium, welches ein optimales Wachstum garantiert. Auch wenn *P. orbiculare*, *P. ovale* und *P. pachydermatis* auf Medium B (nach Nazarro-Porro et al., 1977) inkubiert wurden, konnte bei diesen Spezies die Ausbildung kurzer Filamente beobachtet werden (Faergemann und Bernander, 1981). Die eigenen Versuche, Hyphenbildung unter erhöhter CO₂-Spannung, unter erhöhter O₂-Spannung und unter anaeroben Bedingungen zu induzieren, blieben bei allen *Malassezia*-Spezies inklusive *Malassezia furfur* erfolglos. Das könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei unseren Versuchsmedien um Mangelnährmedien handelt und diese sich von denen, die in der Literatur angegeben sind, deutlich unterscheiden. Bei den Versuchen im Flüssigmedium fiel auf, dass neben der Aminosäure Glycin ein weiterer Faktor für die Hyphenbildung von entscheidender Bedeutung ist. Je größer das Verhältnis zwischen der Oberfläche des Mediums zur Luft und dem Volumen des Mediums ist, umso stärker bildete *Malassezia furfur* Hyphen aus. Es war möglich, bei einem Oberflächen-Volumen-Verhältnis von 0,36 in einer Schott-Glasflasche bei *Malassezia furfur* nach 72 h im Hypheninduktionsmedium unter Glycin-Zugabe bereits 855.000 Hyphen pro ml Medium zu zählen. Im Vergleich dazu konnten unter gleichen Bedingungen mit einem OVV von 0,2 und 0,1 gerade mal 1.000 Hyphen pro ml Medium induziert werden. Wichtig war in diesem Zusammenhang auch der Zeitpunkt der Hypheninduktion. Bei einem OVV von 0,36 wurden von *Malassezia furfur* bereits nach 26 h Hyphen ausgebildet, während das bei einem OVV von 0,2 und 0,1 erst nach 29 h bzw. nach 30 h gelang. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte der regelmäßige

Kontakt der Pilzzellen mit der Luftsäule in der Flasche bei den unterschiedlichen Flaschengrößen sein. Je mehr Möglichkeiten die Hefezellen haben, an die Luft in der Schott-Glasflasche zu gelangen und je öfter dies durch ein entsprechend großes Gefäß ermöglicht wurde, desto mehr Hyphen wurden ausgebildet. Die Deckel der Schott-Flaschen verschlossen hierbei, ohne vollständig zuge dreht zu werden, die Flaschenhalse der Schott-Glasflaschen, wodurch der Sauerstoffpartialdruck vermutlich niedriger ausfiel als in der eigentlichen Außenluft. Durch das Gewinde und die Tiefe der Kunststoffdeckel liegt der Deckel sehr eng dem Flaschenhals auf, so dass kaum frische Außenluft in die Flasche gelangen kann. Das würde die Ergebnisse von Faergemann und Bernander von 1981 bestätigen, nach denen es zu einer Hyphenbildung unter mikroaeroben Bedingungen kommt und das Wachstum unter anaeroben Bedingungen stark eingeschränkt ist. Würde man wiederum reinen Sauerstoff in die Kultur einleiten, würde diese Veränderung vermutlich nicht zu einer Hyphenbildung führen, bzw. diese stoppen, da der Pilz nach den Untersuchungen von Faergemann und Bernander mikroaerobe Bedingungen bevorzugt. Interessant ist weiterhin, dass die Hyphenbildung in diesem Maße nur in den verschiedenen Schott-Glasflaschen induziert werden konnte, nicht aber in den anderen Glasgefäßen. Ein Erklärungsversuch hierfür wäre, dass die Glasoberfläche der Gefäße von ihrer Beschaffenheit und Struktur unterschiedlich war und dass die Hefe eine bestimmte Oberfläche bzw. Haftungsmöglichkeit benötigt. Diese Hypothese müsste allerdings noch genauer untersucht werden. Dafür müsste man bei den verschiedenen Herstellern die genaue Zusammensetzung und das genaue Herstellungsverfahren des Glases der unterschiedlichen Gefäße erfahren und die Versuche mit Gläsern der gleichen Zusammensetzung und Herstellung, aber unterschiedlicher Formen wiederholen. Des Weiteren würde sich eine elektronenmikroskopische Untersuchung der verschiedenen Gläser mit genauerer Betrachtung der Haftungsoberfläche anbieten. Eine andere Erklärung für die vermehrte Hyphenbildung in den Schott-Glasflaschen wäre, dass die Öffnungen der anderen Glasbehälter lediglich mit Alufolie abgedeckt wurden und dadurch ein größeres Sauerstoffangebot in der Luftsäule dieser Flaschen vorherrschte.

Nachdem es gelungen war, ein Hypheninduktionsmedium mit geeigneten Rahmenbedingungen zu entwickeln und damit erfolgreich Hyphen *in vitro* bei *Malassezia furfur* zu induzieren, stellte sich nun die Frage, ob es auch auf

molekularbiologischer Ebene möglich ist, einen Einblick in die Hyphenbildung zu bekommen und diese weiter aufzuklären. Bisher sind von *Malassezia furfur* lediglich die ITS (internal transcribed spacer)-Regionen der rDNA (Makimura et al., 2000), ein paar rRNA-Sequenzen (Guillot und Guého, 1995), eine Chitinsynthase (Kano et al., 1999; Kano, 2005), eine Lipase (Brunke und Hube, 2006), ein Fragment des Cytochrom b-Gens (Biswas et al., 2001) und diverse Allergene (Andersson et al., 2003; Onishi et al., 1999; Yasueda et al., 1998) bekannt. Im Gegensatz dazu ist das Genom von *Malassezia globosa* und *Malassezia restricta* bereits erfolgreich sequenziert worden (Dawson, 2007; Xu et al., 2007). Es musste also eine molekularbiologische Methode gefunden werden, die ohne Kenntnis des Genoms eines Organismus auskommt und eine Erfassung von Genen ermöglicht, deren Expression die Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* hervorruft. Zu diesem Zweck wurde das cDNA-Subtraktionsverfahren herangezogen, welches auch unter dem Namen Subtraktive-Suppressions-Hybridisierung bekannt ist (Diatchenko et al., 1996). Dieses Verfahren erfüllt alle für die Versuche nötigen Voraussetzungen und war in der Vergangenheit bereits bei *Malassezia furfur* im Rahmen der Pigmentsynthese erfolgreich (Lang, 2010). Die cDNA-Subtraktion ermöglicht den Vergleich zweier mRNA-Populationen und liefert Klone, welche in der einen Population (Tester) exprimiert werden und in der anderen nicht (Driver). In diesem Fall handelt es sich bei der Tester-Population um die in cDNA umgeschriebene mRNA der hyphenbildenden Glycin-Kultur und bei der Driver-Population um die in cDNA umgeschriebene mRNA der nicht-hyphenbildenden Alanin-Kultur. Durch den Vergleich sollen die differentiell exprimierten Gene ermittelt werden, die während der Glycin-abhängigen Hypheninduktion hochreguliert werden. Ein weiteres Screening der gefundenen Sequenzen mittels reversem Northern Blot ist im Anschluß noch nötig, da nach der Subtraktion dennoch ein recht hoher Anteil nicht differentiell exprimierter Sequenzen als so genannter Hintergrund vorhanden ist (Gurskaya et al., 1996). Durch die cDNA-Subtraktion 6 Stunden nach Beginn der Hypheninduktion konnten aus 991 Klonen 83 Sequenzen erfolgreich identifiziert und sequenziert werden. Die cDNA-Subtraktion wurde exakt 6 h nach der Hypheninduktion gewählt, da in der Arbeit von Lang (2010) nach 5 h eindeutig mehr Sequenzen identifiziert werden konnten als nach 3 h. Da keine weiteren Vergleichswerte vorliegen, wurde in diesem Fall der Zeitraum 6 h nach Hypheninduktion gewählt, um eine möglichst große Ausbeute an Sequenzen zu erhalten. Von den 83 erfolgreich identifizierten

Sequenzen wiesen wiederum 65 Sequenzen in der NCBI tblastx-Suche signifikante Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinen auf. Bei den meisten Treffern (29 Sequenzen) handelte es sich um hypothetische Proteine aus *Ustilago maydis*. Die zweithäufigsten Treffer waren nicht klassifizierte Proteine aus *Malassezia globosa* (20 Sequenzen). Bei 16 Sequenzen handelt es sich um hypothetische Proteine, die anderen Organismen als *Malassezia globosa* und *Ustilago maydis* zugeordnet werden konnten. Des Weiteren gab es sehr viele Sequenzüberschneidungen, so dass 16 verschiedene Contigs mit Sequenzähnlichkeiten gebildet werden konnten. Die Einteilung der verschiedenen Contigs unterschied sich allerdings teilweise von der Einteilung der Sequenzen aus der blast-Suche. Es gelang, die verschiedenen Sequenzen anhand funktioneller Aspekte des MIPS yeast Functat einzuteilen. Dabei fiel deutlich auf, dass viele Sequenzen immer wieder für die gleichen Proteine kodieren. Bisher ist für *Malassezia furfur* ein möglicher Tryptophan-abhängiger Pigmentstoffwechsel bekannt geworden sowie das Schlüsselenzym dazu, eine Tryptophan-abhängige Aminotransferase (Irlinger, 2002; Lang, 2010). Ein Modellstoffwechselweg, der die Hyphenbildung von *Malassezia furfur* beschreibt, ist im Gegensatz dazu noch nicht entworfen bzw. bekannt geworden. Daher wurde zum Vergleich der Ergebnisse der bereits bekannte Modellstoffwechselweg aus *Ustilago maydis* herangezogen. Es handelt sich bei diesem Pilz um einen sehr nahen hyphenbildenden Verwandten von *Malassezia furfur*, dessen Genom bereits vollständig sequenziert und analysiert ist. Er ist der Erreger des Maisbeulenbrandes, bei dem die Hyphenbildung mit der Pathogenese dieser Erkrankung im Zusammenhang steht. Anhand der Untersuchungen von Böhmer et al. (2007) konnten einige Gene bei *Ustilago maydis* erfasst werden, die für die Hyphenbildung kodieren und sich gleichzeitig in die Pathogenese eingliedern lassen (Abb. 21 Kapitel 4.2.8). Die Autoren identifizierten mehr als 250 Proteine, indem sie 2-DE Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation mit MALDI-TOF-MS und ESI-MS/MS Analysen kombinierten, und sie konnten dadurch eine Referenzkarte des Proteoms von *Ustilago maydis* erstellen. In diesem Zusammenhang war es ihnen möglich, die Fülle an cytosolischen Proteinen in filamentösen Zellen zu bestimmen und sie mit Zellen, die sich in Knospung befanden, zu vergleichen. Das Hyphenwachstum wurde durch zwei unabhängige Abläufe ausgelöst, durch Überexpression des bw2/bE1-Heterodimers oder durch Überexpression des GTP-bindenden Proteins Rac1. Böhmer et al. (2007) verglichen die beiden Expressionsprofile und konnten 13 Proteinspots identifizieren,

die während des filamentösen Wachstums gesteigert und durch bW2/bE1 induziert wurden (Böhmer et al., 2007). In dem Modell (Abb. 21) ist zu sehen, dass der cAMP- und Proteinkinase-A-Signaltransduktionsweg nach Pheromonaufnahme über das heterotrimere G-Protein Gpa3 aktiviert wird. Im weiteren Verlauf werden zuerst die Gene unterdrückt, die an der Morphologie der Filamente beteiligt sind, wie z.B. SEP 3, Yak C und Actin. Gleichzeitig wird über den Transkriptionsfaktor Prf1 der b-locus aktiviert. Das nun aktive b-Heterodimer (bW1/bE2) führt zu einer Hyphenbildung durch die GTPase Rac1 und unterbindet gleichzeitig die vorher aktivierte Repression von SEP3, Yak C und Actin. Gleichzeitig werden durch den b-Lokus Proteine aktiviert, die eine Rolle in der Pathogenese von *Ustilago maydis* spielen. Bei einem dieser genannten Proteine handelt es sich um eine PEP4-Aspartyl-Protease (UM04926) aus *Ustilago maydis*. In dieser Arbeit konnte mit den Sequenzen Nr. 385, 475, 654, 620, 655 und 666 ein Gen identifiziert werden, das signifikante Ähnlichkeiten zur molekularen Grundlage der PEP4-Aspartyl-Protease, oder auch Proteinase A genannt, aufweist (UM04926). Durch die enge Verwandtschaft der beiden Hefen liegt es nahe, dass dieses Protein auch bei der Hyphenbildung in *Malassezia furfur* eine entscheidende Rolle spielt. Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der in diesem Modell nicht aufgeführt ist, ist eine MAP-Kinase-Kaskade. Sie leitet ebenso das Pheromonsignal weiter, induziert dadurch auch die mehrfache Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Prf1, und führt weiterhin auch zu einer Expression der b-Gene wie beim cAMP-Weg (Hartmann et al., 1996; Kaffarnik et al., 2003; Zarnack et al., 2008). Über die genaue Regulation bzw. die Aktivierung dieser beiden Wege ist jedoch noch nichts Genaues bekannt. Es ist aber durchaus möglich, dass ein ähnlicher Stoffwechselweg mit einem cAMP-Signaltransduktionsweg bzw. mit einer MAP-Kinase-Kaskade für *Malassezia furfur* existiert. *Saccharomyces cerevesiae* weist neben *Ustilago maydis* ebenso eine PEP4-Aspartyl-Protease auf (Woolford et al., 1986). Des Weiteren sind Aspartyl-Proteasen neben anderen Proteinen unter den am häufigsten sezernierten Proteinen bei *Malassezia globosa* zu finden und werden somit auch hier mit der Pathogenität dieser Hefe in Zusammenhang gebracht (Dawson, 2007; Xu et al., 2007). Auch bei *Candida albicans* werden Aspartyl-Proteasen als Virulenzfaktoren diskutiert (Cutler, 1991; Hube, 1996; Rüchel et al., 1992). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass *Ustilago maydis*, *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevesiae* *in vitro* besonders gut Hyphen ausbilden, wenn sie auf einem Mangelmedium mit einem niedrigen

Stickstoffanteil inkubiert werden (Kernkamp, 1939; Lengeler et al., 2000; Sánchez-Martínez und Pérez-Martín, 2001). Auch *Malassezia furfur* bildet Hyphen auf einem Mangelnährmedium aus, dessen einzige Stickstoffquelle die Aminosäure Glycin ist. Bei *Saccharomyces* sind Proteasen sowie die PEP4-Aspartyl-Protease an einer massiven Proteolyse beteiligt, wenn die Zellen bei zu geringem Stickstoff-Angebot hungern bzw. mit der Verwertung von Peptiden beschäftigt sind (Jones, 1984). Dies bedeutet, dass die Hyphenbildung auch eine Reaktion des Pilzes auf Stress sein könnte. Stress aufgrund von Mangelnährnahrung könnte zu einer Neuorganisation des Zellstoffwechsels führen und damit gleichzeitig zu einer neuen Enzymzusammensetzung. Die hervorgerufene Proteolyse von in dieser Situation unwichtigen Proteinen würde somit alle Aminosäuren für eine Synthese neuer Proteine und die nötige Energie bereitstellen. Bisher ist bei *Malasszia furfur* nichts über eine direkte Proteolyse bekannt. Es könnte aber sein, dass die Proteasen nicht nur eine Proteolyse induzieren, sondern möglicherweise auch bei anderen lytischen Prozessen eine Rolle spielen, zum Beispiel wenn der Pilz in die oberflächlichen Hautschichten einwächst. Da das Genom von *Malasszia furfur* noch nicht vollständig analysiert wurde, ist dieser Gedankengang lediglich ein möglicher und noch nicht entdeckter Erklärungsansatz.

Ein weiteres in dieser Arbeit identifiziertes Protein wurde in der Arbeit von Böhmer et al. beschrieben. Es handelt sich um die Sequenzen 16, 17, 506, 507, 657 und 658 des Contig Nr. 8 (UM01753), die einem Galaktose-induzierten GCY1-Protein aus *Ustilago maydis* gleichen. Das GCY1 gehört der Keto-Reduktase-Familie an. Dieses Protein zeigte sich anhand von Protein-Spots mit erhöhter Intensität nach dem Übergang der Zellen in die Hyphenform (Böhmer et al., 2007). In *Saccharomyces cerevesiae* besitzt das Enzym katalytische und Cosubstrat-bindende Reste und es zeigt NADPH-spezifische Reduktase-Aktivität. Allerdings unterscheiden sich die katalytischen Eigenschaften von denen anderer bekannter Aldo-Keto-Reduktasen. Warum das so ist und welche Auswirkungen das wiederum auf die Substratbindung und die enzymatischen Eigenschaften hat, ist noch nicht geklärt (Hur und Wilson, 2001). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das *GCY1*-Gen absolut Protein-Kinase-A abhängig ist und dieses Gen daher nicht nur eine Rolle im Glycerol-Metabolismus spielt (Norbeck und Blomberg, 2000). Es ist daher durchaus möglich, dass es ebenfalls im cAMP-Signaltransduktionweg während der Hyphenbildung

hochreguliert wird und pathogenetischen Einfluss hat. Normalerweise ist das GCY1 besonders bei Galaktose als einziger Energiequelle aktiv und sehr gering aktiv, wenn Glucose vorhanden ist (Magdolen et al., 1990). Leider gibt es keine Angaben zu GCY1 und dessen möglicher Funktion im Stoffwechsel bei *Malassezia globosa* und *Ustilago maydis*. In der Arbeit von Andrews et al. konnten 2004 mit Hilfe des cDNA-Subtraktionsverfahrens differentiell exprimierte Gene aus *Ustilago maydis* identifiziert werden, die während der Hyphenbildung hochreguliert werden. Bei einem Gen handelt es sich um das *uor1*, welches wie das GCY1 Protein zur Aldo-Keto-Reduktase-Familie und somit zu den Oxireduktasen gehört (Andrews et al., 2004). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf ein mögliches hyphenassoziiertes Gen in *Malassezia furfur* sein. Es handelt sich zwar nicht genau um das *GCY1*-Gen, allerdings ließe es sich funktionsbedingt darauf übertragen, da es sich jeweils um Oxireduktasen handelt, die genau während der Hyphenbildung hochreguliert werden.

Darüber hinaus fand sich in der tblastx-Suche ein hoher Anteil an Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu Proteinen des Primärmetabolismus. Diese Proteine sind an der Bindung von Eisen und Eisen-Schwefel-Clustern sowie am Einbau von Eisen und exogenem Schwefel in einen Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt. Zudem transportieren die IscU-Proteine die synthetisierten Eisen-Schwefel-Cluster aus dem Mitochondrium hinaus. Bei diesen Sequenzen handelt es sich um die Sequenzen mit den Nummern 4, 5, 77, 78, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 103, 104 und 639 aus dem Contig Nr. 2. Eisen-Schwefel-Proteine kommen ubiquitär im Körper vor, und sie sind an vielen grundlegenden biochemischen Prozessen in nahezu jeder lebenden Zelle beteiligt. In Hefen ist die mitochondriale Eisen-Schwefel-Cluster-Montage ein mehrstufiger und sehr kontrollierter Protein-gesteuerter Prozess (Frazzon et al., 2002; Lill et al., 2006). Obwohl die Eisen-Bindungsfähigkeit der IscU-Orthologe gut dokumentiert ist, sind die molekularen und mechanischen Details hierzu immer noch unklar. Das IscU-Protein (IscU1 und IscU2) ist ein Gerüstprotein des U-Typs, welches in der mitochondrialen Matrix liegt, für die Zelle überlebenswichtig ist und den primären Standort für die Eisen-Schwefel-Cluster-Montage bietet (Schilke et al., 1999). Es ist wichtig, dass die Montage fest in der Zelle reguliert wird, da freies Eisen und Schwefel giftig für die Zelle sind (Rawat und Stemmler, 2011). Interessant wäre sicherlich, eine Untersuchung an *Malassezia furfur* durchzuführen, in der dem Hypheninduktionsmedium Schwefel und Eisen getrennt als auch zusammen zugefügt

wird. In diesem Versuch sollte dann das Wachstum und gleichzeitig die Morphologie und die Hyphenbildung der Hefe untersucht werden. Man müsste geringe und verschieden hohe Konzentrationen an Eisen und Schwefel einsetzen, damit man unter diesen Bedingungen die Wachstumsfähigkeit des Pilzes beurteilen kann, ohne das sie dabei toxisch wirken. In Bakterien gibt es drei verschiedene Wege für die Herstellung von Eisen-Schwefel-Clustern: 1. der Stickstoff-Fixations Weg (Nif-Weg), der für die Reifung von Nitrogenase dient, 2. der allgemeine Eisen-Schwefel-Cluster-Weg (ISC-Weg), der die Möglichkeiten für viele Bedürfnisse der Zelle bereitstellt und 3. einen Schwefel-Mobilisierungs-Weg (SUF-Weg), der unter oxidativem Stress besonders aktiv ist (Ayala-Castro et al., 2008; Bandyopadhyay et al., 2008; Fontecave und Ollagnier-de-Choudens, 2008). Ein direkter Zusammenhang zur Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* lässt sich nicht herstellen, allerdings ist es denkbar, dass durch die veränderte Stoffwechselleistung ein erhöhter Bedarf an Eisen-Schwefel-Proteinen vorherrscht. In *Ustilago maydis* ist nachweislich ein Eisenaufnahme-System für die Virulenz erforderlich (Eichhorn et al., 2006). Somit wäre von Interesse, ob es auch bei *Malassezia furfur* ein ähnliches System gibt und entsprechend ein erhöhter Eisenbedarf vorherrscht. Allerdings wäre es auch möglich, dass aufgrund der Mangelerkrankung des Pilzes eine Stresssituation entsteht, die der Pilz dann mit einer erhöhten Produktion von Eisen-Schwefel-Clustern beantwortet. Eisen-Schwefel-Cluster sind Cofaktoren für sämtliche Enzymreaktionen, wie zum Beispiel in der Atmungskette, dem Citratzyklus und dem Eisenstoffwechsel. Eisen-Schwefel-Cluster werden in genau solchen Stresssituationen benötigt. Dafür würde auch ein erhöhtes Vorkommen von Sequenzen sprechen, die Ähnlichkeiten in der blastx-Suche zu Enzymen aufweisen, die mit Fremdstoffwechsel und Stressantwort in Zusammenhang gebracht werden. Bei den translatierten Sequenzen Nr. 25, 73, 94, 347, 428, 499, 508, 584 und 660 aus dem Contig Nr. 7 fanden sich zum Beispiel Ähnlichkeiten zu einer Glutathion-S-Transferase, oder die Sequenzen Nr. 160 und 161 aus dem Contig Nr. 5, die Ähnlichkeiten zu einem E2 Ubiquitin-konjugierendem-Enzym aufwiesen. Die Glutathion-S-Transferase spielt eine zentrale Rolle bei der Entgiftung organischer Stoffe.

Auffällig ist der hohe Anteil translatisierter Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu Proteinen des Stofftransports. Unter den Sequenzen 74, 106, 107, 395, 410, 416, 417, 434, 435 und 682 finden sich Homologien zu einem Ctr-Kupfer-Transport-Protein aus dem

funktionellen Bereich Zell-Transport. Kupfer ist ein wichtiger Cofaktor bei unterschiedlichen Prozessen wie Atmung, Eisentransport, oxidativem Stress, Schutzfunktionen der Zelle, Hormon-Produktion und Pigmentierung. Im Zusammenhang mit der Virulenz könnte ein erhöhter Eisenbedarf erforderlich sein. Allerdings könnten auch stressbedingte Umstände zu einem erhöhten Bedarf der Transportproteine führen (Atmung, oxidativer Stress). Weitere Ähnlichkeiten zu Transportproteinen finden sich bei den Sequenzen 74, 395, 410 und 682, die in der tblastx-Suche als Treffer ein putatives TonB-Transport-Protein angeben. Das TonB-Protein ist ein Energie-Transduktions-Protein, welches in gram-negativen Bakterien den aktiven Transport von Eisen-III-Siderophoren durch die äußere Membran mit Hilfe von äußeren Membranproteinen vermittelt (Ferguson et al., 1998). In der Literatur ist beschrieben, dass die bakterielle Virulenz *in vivo* und die Expression von hochaffinen TonB-abhängigen Eisenaufnahme-Systemen miteinander korrelieren und somit die Anpassung und das Überleben der Bakterien im Wirtsorganismus ermöglichen (Braun und Hantke, 1998; Guerinot, 1994). Möglicherweise ist auch die Virulenz von *Malassezia furfur* mit einem ähnlichen Protein bzw. mit Eisen und dessen Transport verbunden, was auch das gehäufte Auftreten von IscU-Proteinen erklären würde. Ansonsten wären diese Transport-Proteine eine Erklärung für eine erhöhte Stoffwechselleistung des Pilzes, um sich an die veränderte Nährstoffsituation anzupassen. Allerdings sind dies nur theoretische Mutmaßungen, da bisher noch kein Stoffwechselweg für die Hyphenbildung in *Malassezia furfur* bekannt ist. Das *ompW*-Gen kodiert für ein äußeres Membranprotein, welches wiederum mit dem TonB-Transport-Protein assoziiert sein soll (Wei et al., 2001). Homologien für so ein *ompW*-Gen zeigt die Sequenz Nr. 163. Ein weiterer Hinweis für die erhöhte Stoffwechselanforderung an den Organismus ist die Sequenz 198 aus dem funktionellen Bereich der Protein-Synthese, die Ähnlichkeiten zu einem L24-Ribosomalen-Protein aufweist. Hinzu kommen die Sequenzen 2, 10 und 422 aus der funktionellen Gruppe des Zellzyklus und der DNA-Entwicklung, die Ähnlichkeiten zu einem mTERF-domain-containing-protein 2 (Sequenz Nr. 2) und einer reversen Transkriptase (Sequenzen Nr. 10 und 422) aufweisen, was auch für eine erhöhte Stoffwechselleistung der Hefe spricht. Neben den hier erwähnten Proteinen ließen sich zusätzlich Sequenzen identifizieren, deren Translationsprodukte Ähnlichkeiten zu einer Cyanate-Lyase (Sequenz Nr. 212), einem Gen für eine Arsenat-Reduktase (Sequenz 149) und zu kompletten Genomsequenzen (Sequenzen: 13, 27) hat. Für diese

Homologien konnte allerdings kein Zusammenhang zur Hyphenbildung hergestellt werden. Darüber hinaus fanden sich Ähnlichkeiten zu einem Protein, dessen Funktion bisher weder für *Malassezia globosa* noch für *Ustilago maydis* genauer beschrieben wurde (Sequenzen Nr. 15a, 15b, 146, 147, 656a, 656b, A155, A157, 213). Des Weiteren konnte für einige Sequenzen keine Ähnlichkeit zu Proteinen mittels blast-Suche gefunden werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit Hilfe des cDNA-Subtraktionsverfahrens bereits einige Sequenzen Genen zugeordnet werden konnten, denen eine Relevanz in der Hyphenbildung zugeschrieben wurde. Das weist darauf hin, dass diese Gene auch bei der Hyphenbildung von *Malassezia furfur* eine Rolle spielen und auch an der Pathogenese der PV beteiligt sein könnten. Eine genauere Charakterisierung der Gene mit direkter Eingliederung in einen hyphenassoziierten Stoffwechsel ist aufgrund der fehlenden molekularbiologischen Kenntnisse über *Malassezia furfur* bislang noch nicht möglich. Zudem bleibt noch ungeklärt, ob die identifizierten Gene direkt mit der Hyphenbildung in Zusammenhang gebracht werden können, ob sie an der Synthese von hyphenbildenden Proteinen beteiligt sind, oder ob es sich lediglich um Gene handelt, die während einer Stresssituation wie zum Beispiel bei Nahrungsmangel oder einseitigem Substratangebot hochreguliert werden.

Um diese Fragen weiter aufzuklären und um die Bedeutung der Gene in diesem Zusammenhang weiter abzuklären, wäre ein Ziel zukünftiger Untersuchungen, die Expression dieser Gene in infizierten Hautbereichen mit PV mittels RT-PCR weiter zu untersuchen. Auf diese Weise könnten auch Transkripte aus Schuppen der mit PV befallenen Hautbezirke nachgewiesen werden und somit unter Umständen ein Zusammenhang zwischen den Gensequenzen und der Hyphenbildung hergestellt werden. Es könnte so eventuell eine Verbindung zur Pathogenese der PV hergestellt werden. Eine weitere Möglichkeit, die Hyphenbildung von *M. furfur* genauer zu untersuchen, wäre der Einsatz von Deletionsmutanten. Man könnte mit Hilfe der anderen Spezies die natürlicherweise keine Hyphen bilden können, die Funktionen der Hyphen-assoziierten Gene von *M. furfur* weiter erforschen. In einer aktuellen Arbeit konnte mittels cDNA-Subtraktionsverfahren und semiquantitativen PCR-Verfahren bereits ein Schlüsselenzym der Tryptophan-abhängigen Pigmentsynthese gefunden werden (Lang, 2010). In einer weiteren Arbeit konnte mit

Transaminaseinhibitoren genau dieses Enzym, eine Tryptophan-abhängige-Aminotransferase (Mf_tam1) gehemmt werden, was die Pigmentsynthese auf der Haut stoppte (Vöhrs, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten anhand des bekannten Genoms von *Ustilago maydis* bereits einige potentielle für die Hyphenbildung verantwortliche Gene identifiziert werden. Die Gensequenzen, die Ähnlichkeiten zu einer PEP4-Aspartyl-Protease, einem *GCYI*-Gen und einem Eisen-Schwefel-ähnlichem-Protein aufweisen, sollten in diesem Zusammenhang genauer untersucht werden. Des Weiteren sind Transkripte mit Ähnlichkeiten zu einem Protein mit noch unbekannter Funktion von Interesse. In der Vergangenheit wurden mit der semiquantitativen PCR gute Erfolge erzielt; somit würde sich, dieses Verfahren zunächst anbieten. Falls sich bei weiteren Untersuchungen bestätigen sollte, dass die bisher identifizierten Sequenzen an der Hyphenbildung von *Malassezia furfur* beteiligt sind und sich diese Transkripte auch in Schuppen der Läsionen der PV nachweisen lassen, könnte zukünftig auch ein therapeutischer Nutzen daraus gezogen werden. Da es mittlerweile gelungen ist, einen Hemmstoff für die Tryptophan-abhängige-Aminotransferase zu etablieren, wäre Vergleichbares auch für die Hyphenbildung denkbar. Bei einem direkten Zusammenhang zwischen der Hyphenbildung und der Pathogenese der PV wäre es dann möglich, eine Hemmung der dafür verantwortlichen Proteine und somit eine Unterbrechung der Hyphenbildung zu ermöglichen. Hierdurch könnte ein Ausbruch der Erkrankung und dessen Ausbreitung auf der Körperoberfläche verhindert werden. Bei *Malassezia globosa* Hyphenbildung *in vitro* zu induzieren, war bisher noch nicht möglich, obwohl diese *Malassezia*-Spezies auf der Haut sehr wohl Hyphen ausbildet (Crespo-Erchiga et al., 2000; Crespo-Erchiga und Florencio, 2006). Da *Malassezia globosa* in unseren Breiten als eigentlicher Auslöser der PV gilt (Crespo-Erchiga et al., 2000), wäre es interessant, ob sich die Daten von *Malassezia furfur* auf *Malassezia globosa* übertragen lassen, oder ob *Malassezia furfur* nicht vielleicht sogar als Modellorganismus für *Malassezia globosa* dienen könnte, da diese Hefe weitaus besser zu kultivieren ist. Andererseits sollte dennoch versucht werden, die Kulturbedingungen im Hypheninduktionsmedium für *Malassezia globosa* und *Malassezia sympodialis* zu optimieren, da *Malassezia globosa* schon unter optimalen Bedingungen nur sehr schwer zu kultivieren ist und *Malassezia sympodialis* offensichtlich auch andere Substratbedingungen für eine Hyphenbildung *in vitro* benötigt. Da man heute davon ausgeht, dass es sich bei dem ehemaligen *Pityrosporum*

orbiculare um *Malassezia globosa* handelt, läge es nahe, das Kulturmedium von Faergemann und Bernander von 1979 für eine Anzüchtung bzw. eine Hypheninduktion für *Malassezia globosa* zu nutzen und eventuell noch zu modifizieren. Weiterhin sollte die Bedeutung der Aminosäure Glycin und die des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses für die Hyphenbildung noch genauer abgeklärt werden, da diese Umstände bei *Malassezia furfur* offenbar entscheidende Faktoren für eine Hypheninduktion sind. Auf der normalen Haut machen Glycin und Serin zusammen 40% der freien Aminosäuren aus, und die Konzentration von Glycin auf erkrankter Haut ist etwas höher als auf gesunder (Burke, 1962). Auch *in vitro* kann durch Glycin und Serin eine Hyphenbildung erreicht werden (Mayser et al., 1998a). Glycin ist eine hydrophile Aminosäure, die in hohen Konzentrationen besonders im Schweiß im Fall von Hyperhidrosis vorkommt. Hyperhidrosis stellt einen Prädispositionsfaktor für die PV dar, genauso wie eine erhöhte Okklusion. Das würde wiederum mit den Beobachtungen zur Hyphenbildung bei verschiedenen Oberflächen-Volumen-Verhältnissen der Kulturgefäße korrelieren, und dann wäre neben der Aminosäure Glycin auch das Verhältnis zwischen Sauerstoff und CO₂ von entscheidender Bedeutung, was durch die Anzüchtung in 400 ml Schott-Glasflaschen *in vitro* besonders gut nachgestellt werden konnte.

Zusammenfassend können die eingangs gestellten Fragen abschließend wie folgt beantwortet werden:

1.) Unter welchen *in-vitro*-Bedingungen können bei *Malassezia*-Hefen Hyphen induziert werden?

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass *in vitro* bei *Malassezia furfur* 7019 auf einem festen 1b-Mangelnährmedium unter Zugabe der Aminosäure Glycin als alleiniger Stickstoffquelle Hyphen induziert werden können. Auch ließ sich in einem Flüssigmedium der gleichen Zusammensetzung bei *Malassezia furfur* 7019, 1878, S313, 6094 die Bildung von Hyphen induzieren. Bei einem Oberflächen-Volumen-Verhältnis von 0,36, bei dem die Hefe regelmäßig Kontakt mit der Luftsäule über dem Medium hatte, gelang die Hypheninduktion besonders erfolgreich.

2.) Welche der *Malassezia*-Spezies sind zur Hyphenbildung fähig?

In den vorliegenden Untersuchungen war es möglich, bei *Malassezia furfur* unter oben genannten *in-vitro*-Bedingungen eine Hyphenbildung zu induzieren. Bei dem *Malassezia*-Spezies *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. slooffiae* und *M. sympodialis* konnte unter den gleichen Bedingungen zwar ein Wachstum hervorgerufen werden, aber keine Hyphenbildung. Bei *Malassezia globosa* war es nicht möglich, *in vitro* Hyphen zu induzieren oder ein Wachstum hervorzurufen. Diese Hefe konnte unter oben genannten Bedingungen nicht genauer untersucht werden.

3.) Das Genom von *Malassezia furfur* ist bislang noch nicht bekannt. Lassen sich dennoch Gensequenzen identifizieren, die für die Hyphenbildung verantwortlich sind?

In dieser Arbeit konnten trotz Unkenntnis des Genoms von *Malassezia furfur* einige Gensequenzen identifiziert werden, die möglicherweise mit der Hyphenbildung assoziiert sind

4.) Mit welchen molekularbiologischen Methoden können mögliche Gensequenzen identifiziert werden?

Anhand des cDNA-Subtraktionsverfahrens können für die Hyphenbildung mögliche Gensequenzen ermittelt werden. Bei diesem Verfahren, das ohne Kenntnis des eigentlichen Genoms eines Organismus auskommt, konnten 6 Stunden nach Hypheninduktion aus 991 Klonen 83 Sequenzen erfolgreich identifiziert und sequenziert werden. Von diesen 83 Sequenzen wiesen wiederum 65 Sequenzen in der NCBI-tblastx-Suche signifikante Ähnlichkeiten mit bekannten Proteinen auf.

5.) Können diese Sequenzen durch Abgleich mit anderen Datenbanken der Hyphenbildung zugeordnet werden?

Die differentiell exprimierten Sequenzen wurden einem tblastx-search der NCBI-Datenbank und aufgrund der hohen verwandtschaftlichen Ähnlichkeiten zu *Ustilago maydis* mit der Mips-Datenbank abgeglichen. Hierbei konnte für eine Reihe der identifizierten Sequenzen ein Zusammenhang zur Hyphenbildung zugeschrieben werden. Einige dieser Sequenzen weisen Homologien zu einer PEP4-Aspartyl-Protease aus *Ustilago maydis* (UM04926) auf (Nr. 385, 475, 654, 620, 655 und 666), die sich in einen möglichen hyphenassoziierten Stoffwechsel einordnen lässt (Abb. 21).

Zudem finden sich Ähnlichkeiten zu einem *GCY1*-Gen (Nr. 16, 17, 506, 507, 657 und 658) aus *Ustilago maydis* (UM01753) und *Malassezia globosa* (MGL_2886), zu einem IscU-scaffold-like-protein (Nr. 4, 5, 77, 78, 82, 83, 84, 85, 88, 89, 103, 104 und 639) und zu einem Protein, dem noch keine genaue Funktion bei *Malassezia globosa* und *Ustilago maydis* zugeordnet wurde (Nr. 15a, 15b, 146, 147, 656a, 656b, A155, A157, 213). Diese Sequenzen wiederum könnten aufgrund ihrer funktionellen Zusammenhänge für die Hyphenbildung von Bedeutung sein.

6 Zusammenfassung

Malassezia-Hefen sind die Erreger der Pityriasis versicolor, einer der häufigsten oberflächlichen Hautpilzkrankungen des Menschen. Als mögliche Auslöser dieser Erkrankung werden in den gemäßigten Breiten *Malassezia globosa* und *Malassezia furfur* vermehrt in den tropischen Klimazonen diskutiert. Die Diagnose der Pityriasis versicolor wird vorwiegend klinisch gestellt. Entscheidend für die Diagnose ist allerdings das Auftreten von klumpenartigen Zellhaufen und kurzen, dicken Hyphen im mikroskopischen Bild des Nativpräparates aus Schuppen befallener Hautbezirke. Da das Vorkommen von Hefezellen **und** Hyphen auf befallener Haut zu 100%, auf gesunder Haut allerdings nur zu 6-7% geprägt ist, nimmt man an, dass die Hyphenbildung mit der Pathogenese der PV einhergeht und somit einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellt. Die Pathogenese der PV und der Zusammenhang zur Hyphenbildung konnte bis heute noch nicht aufgeklärt werden. Auch über das Genom von *Malassezia furfur* ist nur sehr wenig bekannt.

In dieser Arbeit war es möglich, *Malassezia*-Hefen auf einem Minimalmedium aus Agar, einer Lipid- und einer Stickstoffquelle wachsen zu lassen. Speziell für Kulturen von *Malassezia furfur* ließen sich mit Glycin als alleiniger Stickstoffquelle sowohl auf festem, wie auch in flüssigem 1b-Minimalnährmedium Hyphen induzieren. In flüssigem Nährmedium spielte hierbei das Verhältnis zwischen Flüssigkultur und der über dem Medium befindlichen Luftsäule eine große Rolle. Weiterhin wurde versucht, auch auf molekularbiologischer Ebene einen tieferen Einblick in die Hyphenbildung zu bekommen. Dies gelang mit dem cDNA-Subtraktionsverfahren, das ohne Kenntnis des Genoms eines Organismus auskommt und mit dem gleichzeitig die genetische Regulation der Hyphenbildung genauer untersucht werden konnte. Die erhaltenen Sequenzen wurden im reversen Northern-Blot auf ihre differentielle Expression gescreent. Die differentiell exprimierten Sequenzen wurden daraufhin sequenziert und mittels translated vs. Translated-blast-Suche (tblastx) mit der NCBI-Gendatenbank und der MIPS *Ustilago maydis*-Gendatenbank abgeglichen. 83 Sequenzen von 991 Klonen der 6 Stunden-Hypheninduktionskultur konnten erfolgreich sequenziert werden. Vier der differentiell exprimierten Sequenzen konnten durch Literaturabgleich mit der Hyphenbildung bei *Ustilago maydis* näher in Verbindung gebracht werden. Diese Sequenzen zeigen Homologien zu einer PEP4-

Aspartyl-Protease, einem GCY1-Gen, einem Iron-Sulfur-Scaffold-like-Protein und einem Protein mit bislang noch unbekannter Funktion. Dies weist darauf hin, dass diese Gene auch bei der Hyphenbildung von *Malassezia*-Hefen eine Rolle spielen könnten. Zur Abklärung ihrer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang allerdings weitere Untersuchungen erforderlich.

Mit dieser Arbeit konnte ein erster Einblick in die genetische Regulation der Hyphenbildung bei *Malassezia furfur* auf molekularbiologischer Ebene geleistet werden. Das Ziel weiterer Arbeiten muss sein, die Expression der identifizierten Sequenzen in Läsionen der PV mittels RT-PCR weiter zu untersuchen. Auf diese Weise kann die Rolle der Hyphenbildung in der Pathogenese der PV weiter aufgeklärt werden.

7 Summary

Malassezia-yeasts are the causative agents of the Pityriasis versicolor, one of the most widespread superficial dermatoses of the human being. Up to now the exact cause of the disease has not yet been definitely clarified. As possible causes of this disease *Malassezia globosa* found in the temperate parts of the world and *Malassezia furfur* found in the tropical climatic zones are brought to discussion with increasing frequency. The diagnosis of Pityriasis versicolor mainly is made clinically. Finally decisive for the diagnosis is the occurrence of lump-like cell heaps and short, thick hyphae (“Spaghetti and meatballs”) in the microscopical picture of the native slide preparation consisting of scales of skin districts attacked. According to yeast cells and hyphae occurring per 100% on attacked skin and per 6-7% only on healthy skin, it is assumed that the formation of hyphae is an important factor in the still unknown pathogenesis of PV. Very little also is described so far about the genome of *Malassezia furfur*.

Growth of *Malassezia*-yeasts was made possible on an 1b-minimal medium containing agar-agar, as well as a lipid- and a nitrogen source. In particular *Malassezia furfur* strains could be cultivated under induction of hyphal growth when using glycine as sole nitrogen source on solid and liquid minimal medium. In liquid cultures the hyphal growth amount obviously depended on the relation between the broth and the extent of air above the minimal medium. Furthermore, to gain a deeper insight into the formation of hyphae on a molecular-biological level c-DNA-substraction-analysis was performed by which informations about the genetic regulation of the process of hyphal formation can be achieved without knowledge of the genome of an organism. Sequences received were screened in the reverse-northern-blot-analysis with regard to their differential expression. The sequences expressed differentially were sequenced and by translated vs. translated-blast-search (tblastx) compared to the NCBI-data base of genes as well as the MIPS *Ustilago maydis* data base of genes. 83 sequences out of 991 clones from the 6-hours-culture of hyphal induction could successfully be sequenced. Four of the sequences expressed differentially could be brought in connection with the forming of hyphae by *Ustilago maydis*, an organism close to *Malassezia*-yeasts. These sequences show homologies as to a PEP4-Aspartyl-Protease, a *GCY1*-gene, an Iron-Sulfur-scaffold-like-Protein

and a protein whose function so far is not yet known. This points out that these gene sequences could play a role in the forming of hyphae by *Malassezia*-yeasts as well. In order to clarify their significances in this connection, further studies are necessary.

According to these results a first insight in the genetic regulation of the forming of hyphae by *Malassezia furfur* could be given on the molecular-biological level. A long-term goal of these studies would be to further investigate the expression of sequences identified in lesions of PV by use of RT-PCR. This could give more clarification about meaning of the formation of hyphae in the pathogenesis of PV.

Literaturverzeichnis

- Abbe NV. The investigation of dandruff. J Soc Cosmetic Chem, 15(11): 609-630, 1964
- Adamson HG. Pityriasis versicolor with subsequent leucodermic patches. Br J Dermatol Syph 61:322, 1949.
- Akaza N, Akamatsu H, Sasaki Y, Kishi M, Mizutani H, Sano A, Hirokawa K, Nakata S, Nishijima S, Matsunaga. Malassezia folliculitis is caused by cutaneous resident Malassezia species. Med Mycol, 47:618-24, 2009.
- Allen HB, Charles CR, Johnson BL. Hyperpigmented tinea versicolor. Arch Dermatol 112:1110-1112, 1976.
- Aly R, Berger T. Common superficial fungal infections in patients with AIDS. Clin Infect Dis 22 Suppl 2:128-132, 1996.
- Andersson A, Scheynius A, Rasool O. Detection of Mala f and Mala s allergen sequences within the genus *Malassezia*. Med Mycol 41:479-485, 2003.
- Andersson A, Rasool O, Schmidt M, Kodzius R, Fluckiger S, Zargari A, Cramer R, Scheynius A. Cloning, expression and characterization of two new IgE-binding proteins from the yeast *Malassezia sympodialis* with sequence similarities to heat shock proteins and manganese superoxide dismutase. Eur J Biochem 271:1885-1894, 2004.
- Andrews DL, García-Pedrajas MD, Gold SE. Fungal dimorphism regulated gene expression in *Ustilago maydis*: I. Filament up-regulated genes. Mol Plant Pathol 5:281–293, 2004.
- Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. Clin Microbiol Rev 15:21-57, 2002.
- Aspiroz C, Moreno LA, Rezusta A, Rubio C. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin. Correspondence with *M. globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. Mycopathologia 145:69-74, 1999.
- Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, Rubio C. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. Mycopathologia 154:111-117, 2002.
- Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev: MMBR 72:110-25, 2008.
- Baillon EH. Traité de botanique médicale cryptogamique suivi du tableau. Paris, Octave Douin: 234-39, 1889.
- Bandyopadhyay S, Chandramouli K, Johnson MK. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Biochemical Society transactions, 36:1112-1119, 2008.
- Barnes WG, Sauer GC, Arnold JD. Scanning electron microscopy of tinea versicolor organisms. (*Malassezia furfur*-*Pityrosporon orbiculare*?). Arch Dermatol, 107:392-394, 1973.
- Baxter M. The association of *Pityrosporum pachydermatis* with the normal external ear canal of dogs and cats. J Small Anim Pract 17:231-234, 1976.
- Benham RW. The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale* - a lipophilic fungus. J Invest Dermatol 2:187-203, 1939.

- Bergbrant IM, Faergemann J. Variations of *Pityrosporum orbiculare* in middle-aged and elderly individuals. *Acta Derm Venereol* 68:537-540, 1988.
- Besnier E, Balzer F. Les dermatomycoses. *Gaz Hebdom Med Chir* 19:326, 341-328, 344, 1882.
- Biswas SK, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1191-1199, 2001.
- Blumenthal HL. Tinea versicolor of penis. *Arch Dermatol*, 103:461-462, 1971.
- Boekhout, T, Gueho-Kellermann, E, Begerow, T. Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure. In: *Malassezia* and the skin (Hrsg: Boekhout, Teun, Mayser, Peter, Guého-Kellermann, Eveline Velegraki, Aristeia Berlin), Vol. 1, Berlin, Heidelberg, Springer:17-64, 2010.
- Böhmer M, Colby T, Böhmer C, Bräutigam A, Schmidt J, Bölker M. Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics*, 7:675-685, 2007.
- Bond R, Anthony RM, Dodd M, Lloyd DH. Isolation of *Malassezia sympodialis* from feline skin. *J Med Vet Mycol* 34:145-147, 1996.
- Bond R, Howell SA, Haywood PJ, Lloyd DH. Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *Vet Rec* 141:200-201, 1997.
- Borelli D, Jacobs PH, Nall L. Tinea versicolor: epidemiologic, clinical, and therapeutic aspects. *J Am Acad Dermatol* 25:300-305, 1991.
- Braun WV, Hantke K. In: *Metal Ions in Biological Systems*. (Marcel Dekker, New York, 1998), pp. 67-145, 1998.
- Breathnach AS, Gross M, Martin B. Freeze-fracture replication of cultured *Pityrosporum orbiculare*. *Sabouraudia* 14:105-113, 1976.
- Brunke S, Hube B. MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus *Malassezia furfur*. *Microbiology* 152:547-554, 2006.
- Burke RC. Investigations in tinea versicolor: lipid and amino acid studies. *Yale J Biol Med*, 35:206-221, 1962.
- Burke RC. Tinea versicolor: susceptibility factors and experimental infection in human beings. *J Invest Dermatol* 36:389-402, 1961.
- Cabañes FJ, Vega S, Castellá G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol* 49:40-8, 2011.
- Cabañes FJ, Theelen B, Castella G, Boekhout T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res* 7:1064-1076, 2007.
- Charles CR, Sire DJ, Johnson BL, Beidler JG. Hypopigmentation in tinea versicolor: a histochemical and electronmicroscopic study. *Int J Dermatol* 12:48-58, 1973.
- Chen TA, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol* 16:4-26, 2005.

- Conklin RJ. Common cutaneous disorders in athletes. *Sports Med* 9:100-119, 1990.
- Cotterill JA, Cunliffe WJ, Williamson B, Bulusu L. Age and sex variation in skin surface lipid composition and sebum excretion rate. *Br J Dermatol* 87:333-340, 1972.
- Crespo-Erchiga V, Ojeda Martos A, Vera Casaño A, Crespo-Erchiga A, Sanchez Fajardoet F. *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor. *Br J Dermatol* 143:799-803, 2000.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Occurrence of *Malassezia spp.* in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 45:333-337, 2002a.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Occurrence of *Malassezia spp.* in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med Mycol* 40:115-121, 2002b.
- Crespo-Erchiga V, Florencio VD. *Malassezia* yeasts and pityriasis versicolor. *Curr Opin Infect Dis* 19:139-147, 2006.
- Crespo-Erchiga V, Hay R. Pityriasis versicolor and other *Malassezia* skin diseases. In: *Malassezia and the Skin* (Boekhout, Teun, Kellermann, Gueho, Mayser), Berlin, Heidelberg, Springer Verlag: 175-200, 2010.
- Cunningham AC, Ingham E, Gowland G. Humoral responses to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in normal individuals of various ages. *Br J Dermatol* 127:476-481, 1996
- Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45:187-218, 1991.
- Dawson Jr. TL. *Malassezia globosa* and *restricta*: Breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 12:15-19, 2007.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025-6030, 1996.
- Dodge CW. Medical mycology. St. Louis, Mosby, 1935.
- Dorn M, Roehnert K. Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture medium. *J Invest Dermatol* 69:244-248, 1977.
- Dotz WI, Henrikson DM, Yu GS, Galey CI. Tinea versicolor: a light and electron microscopic study of hyperpigmented skin. *J Am Acad Dermatol* 12:37-44, 1985.
- Dutta S, Bajaj AK, Basu S, Dikshit A. Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinicomycologic study in India. *Int J Dermatol* 41:823-824, 2002.
- Eichstedt CF. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde* 853:270-271, 1846.
- Eichhorn H, Lessing F, Winterberg B, Schirawski J, Kämper J, Müller P, Kahmann R. A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *The Plant cell*, 18:3332-3345, 2006.
- El-Gothamy Z, Abdel-Fattah A, Ghaly AF. Tinea versicolor hypopigmentation: histochemical and therapeutic studies. *Int J Dermatol* 14:510-515, 1975.

- Faergemann J, Bernander S. *Tinea versicolor* and *Pityrosporum orbiculare*: a mycological investigation. *Sabouraudia* 17:171-179, 1979.
- Faergemann J, Fredriksson T. Age incidence of *Pityrosporum orbiculare* on human skin. *Acta Derm Venereol* 60:531-533, 1980.
- Faergemann J, Bernander S. Micro-aerophilic and anaerobic growth of *Pityrosporum* species. *Sabouraudia* 19:117-121, 1981.
- Faergemann J, Fredriksson T. *Tinea versicolor*: some new aspects on etiology, pathogenesis, and treatment. *Int J Derm*, 21:8-11, 1982.
- Faergemann J, Aly R, Maibach HI. Growth and filament production of *Pityrosporum orbiculare* and *P. ovale* on human stratum corneum in vitro. *Acta Derm Venereol* 63:388-392, 1983a.
- Faergemann J, Aly R, Maibach HI. Quantitative variations in distribution of *Pityrosporum orbiculare* on clinically normal skin. *Acta Derm Venereol* 63:346-348, 1983b.
- Faergemann J. A new model for growth and filament production of *Pityrosporum ovale* (*orbiculare*) on human stratum corneum in vitro. *J Invest Dermatol* 92:117-119, 1989a.
- Faergemann J. Epidemiology and ecology of pityriasis versicolor. *Curr Top Med Mycol* 3:153-167, 1989b.
- Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282:2215-2220, 1998.
- Fontecave M, Ollagnier-de-Choudens S. Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch Biochem Biophys* 474:226-237, 2008.
- Frazzon J, Fick JR, Dean DR. Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem Soc Transact* 30:680-685, 2002.
- Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. *Br J Dermatol* 154:854-859, 2006.
- Galadari I, el KM, Mousa A, Hashimoto K, Mehregan AH. *Tinea versicolor*: histologic and ultrastructural investigation of pigmentary changes. *Int J Dermatol* 31:253-256, 1992.
- Galadari I. Pityriasis versicolor-is it infectious or not? *Gulf J Dermatol* 5:33-35, 1998.
- Gambichler T, Krämer HJ, Boms S, Skrygan M, Tomi NS, Altmeyer P, Mayser P. Quantification of ultraviolet protective effects of pityriacitrin in humans. *Arch Dermatol Res* 299:517-520, 2007.
- Gandra RF, Gambale W, de Cassia Garcia SR, da Silva RL, Durigon EL, de Camargo LM, Giudice MC, Sanfilippo LF, de AJ, Paula CR. *Malassezia* spp. in acoustic meatus of bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. *Mycopathologia* 165:21-26, 2008.
- Garau M, del Palacio A, García J. Prevalence of *Malassezia* spp. in healthy pigs. *Mycoses* 48:17-20, 2005.
- Gordon MA. Lipophilic yeastlike organisms associated with tinea versicolor. *J Invest Dermatol* 17:267-272, 1951a.

- Gordon MA. The lipophilic mycoflora of the skin. I. In vitro culture of *Pityrosporum orbiculare* n.sp. *Mycologia* 43:524-535, 1951b.
- Götz H. Die Pilzkrankheiten der Haut durch Dermatophyten. In: Handbuch für Haut- und Geschlechtskrankheiten. (Hrsg. Marchionini H, Götz A), Bd. 1, Heidelberg, Springer Verlag: 352-360, 1962.
- Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69:337-355, 1996a.
- Guerinot ML. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol.* 48:743-772, 1994.
- Guillot J, Gueho E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67:297-314, 1995.
- Guillot J, Gueho E, Lesourd M. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med* 6:103-110, 1996.
- Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol* 37:295-306, 1999.
- Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC. Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. *Med Mycol* 39:199-206, 2001.
- Gupta AK, Bluhm R, Summerbell R. Pityriasis versicolor. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16:19-33, 2002.
- Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Faergemann J. Pityriasis versicolor. *Dermatol Clin* 21:413-429, 2003.
- Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL, Jr. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 51:785-798, 2004.
- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekoy GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Ann Biochem* 240:90-97, 1996.
- Gustafson BA. The occurrence of yeasts belonging to genus *Pityrosporum* in different kinds of animals. *Acta Pathol Microbiol Scand* 48:51-55, 1960.
- Hafez M, el-Shamy S. Genetic susceptibility in pityriasis versicolor. *Dermatologica* 171:86-88, 1985.
- Hartmann HA, Kahmann R, Bölker M. The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* 15:1632-1641, 1996.
- Hashim FA, Elhassan AM. Tinea versicolor and visceral leishmaniasis. *Int J Dermatol* 33:258-259, 1994.
- Hay RJ, Roberts SOB, Mackenzie DWR. Pityriasis versicolor. In: Textbook of Dermatology (Hrsg : Champion, RH, Burton, JL, Elbing, FJG), Vol 2, Oxford, Blackwell:1286-1290, 1998.
- Hernández Hernández F, Méndez Tovar LJ, Bazán Mora E, Arévalo López A, Valera Bermejo A, López Martínez R. Species of *Malassezia* associated with various dermatoses and healthy skin in the Mexican population. *Rev Iberoam Micol* 20:141-144, 2003.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Thorsten LH, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111:509-547, 2007.

Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:623-627, 2004.

Hort W, Lang S, Brunke S, Mayser P, Hube B. Analysis of differentially expressed genes associated with tryptophan-dependent pigment synthesis in *M. furfur* by cDNA subtraction technology. *Med Mycol*: 47:248-258, 2009.

Hort W, Mayser P. *Malassezia* virulence determinants. *Curr Opin Infect Dis*, 24:100-5, 2011.

Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol*, 7:55-69, 1996.

Hur E, Wilson DK. The crystal structure of the GCY1 protein from *S. cerevisiae* suggests a divergent aldo-keto reductase catalytic mechanism. *Chem Biol Interact*, 130-132:527-536, 2001.

Irlinger B. Strukturaufklärung, Biosynthese und Synthese von Sekundärmetaboliten aus Kulturen von *Malassezia furfur*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002.

Jeliffe DB, Jacobson FW. The clinical picture of tinea versicolor in negro infants. *J Trop Med Hyg* 57:290-293, 1954.

Jones E. The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches. *Annu Rev Genet*, 18:233-70, 1984.

Kaffarnik F, Müller P, Leibundgut M, Kahmann R, Feldbrügge M. PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, 22:5817-5826, 2003.

Kano R, Aizawa T, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A. Chitin synthase 2 gene sequence of *Malassezia* species. *Microbiol Immunol* 43:813-815, 1999.

Kano R. Chitin Synthase 2 (CHS2) gene of *Malassezia* species. *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi* 46:157-161, 2005.

Karakaş M, Turaç-Biçer A, Ilkit M, Durdu M, Seydaoğlu G. Epidemiology of pityriasis versicolor in Adana, Turkey. *J Dermatol* 36:377-82, 2009.

Karaoui R, Bou-Resli M, Al-Zaid NS, Mousa A. Tinea versicolor: ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica* 162:69-85, 1981.

Keddie FM. Electron microscopy of *Malassezia furfur* in tinea versicolor. *Sabouraudia* 5:134-137, 1966.

Kernkamp MF. Genetic and environmental factors affecting growth types of *Ustilago zeae*. *Phytopathol* 29:473-484, 1939.

King RD, Cunico RL, Maibach HI, Greenberg JH, West ML, Jeppsen JC. The effect of occlusion on carbon dioxide emission from human skin. *Acta Derm Venereol* 58:135-138, 1978.

- Koyama T, Kanbe T, Ishiguro A, Kikuchi A, Tomita Y. Isolation and characterization of a major antigenic component of *Malassezia globosa* to IgE antibodies in sera of patients with atopic dermatitis. *Microbiol Immunol* 44:373-379, 2000.
- Krisanty RI, Bramono K, Made W, I. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor in Indonesia and its relationship with clinical characteristics. *Mycoses*, 52:257-262, 2008.
- Kristiakovsky EV. Pityriasis versicolor and ultraviolet rays. *Arch Derm Syph* 15:685-689, 1927.
- Krämer HJ, Dahms K, Podobinska M, Bartsch A, Steglich W, Mayser P. Tryptophan-Stoffwechsel von *Malassezia furfur*: Störung der Pigmentbildung der Haut durch Apoptose von Melanozyten und Tyrosinase-Inhibition. *Mycoses* 47:363, 2004.
- Krämer HJ, Kessler D, Hipler UC, Irlinger B, Hort W, Bodeker RH, Steglich W, Mayser P. Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcylarubin A. *Chembiochem* 6:2290-2297, 2005a.
- Krämer HJ, Podobinska M, Bartsch A, Battmann A, Thoma W, Bernd A, Kummer W, Irlinger B, Steglich W, Mayser P. Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* 6:860-865, 2005b.
- Labows JN, McGinley KJ, Leyden JJ, Webster GF. Characteristic gamma-lactone odor production of the genus *Pityrosporum*. *Appl Environ Microbiol* 38:412-415, 1979.
- Lang SK. Untersuchungen zur genetischen Regulation des Tryptophan-abhängigen Pigmentstoffwechsels von *Malassezia furfur* und Aufklärung der genetischen Sequenz des Schlüsselenzyms Mf _ Tam1 , einer Tryptophan- Aminotransferase. Inaugural Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, 2010.
- Larangeira de Almeida HJr, Mayser P. Absence of sunburn in lesions of pityriasis versicolor alba. *Mycoses* 49:516, 2006.
- Lee KH, Kim YG, Bang D, Kim YA. Scanning electron microscopy of *Malassezia furfur* in tinea versicolor. *Yonsei Med J*, 30:334-338, 1989.
- Leeming JP, Notman FH. Improved methods for the isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J Clin Microbiol*, 5: 2017-2019, 1987.
- Leeming JP, Notman FH, Holland KT. The distribution and ecology of *Malassezia furfur* and cutaneous bacteria on human skin. *J Appl Bacteriol* 67:47-52, 1989.
- Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:746-785, 2000.
- Lill R, Dutkiewicz R, Elsässer HP, Hausmann A, Netz DJ, Pierik AJ, Stehling O, Urzica E, Mühlenhoff U. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1763:652-667, 2006.
- Limacher A, Glaser AG, Meier C, Schmid-Grendelmeier P, Zeller S, Scapozza L, Cramer R. Cross-reactivity and 1.4-Å crystal structure of *Malassezia sympodialis* thioredoxin (Mala s 13), a member of a new pan-allergen family. *J Immunol* 178:389-396, 2007.
- Lindborg M, Magnusson CG, Zargari A, Schmidt M, Scheynius A, Cramer R, Whitley P. Selective cloning of allergens from the skin colonizing yeast *Malassezia furfur* by phage surface display technology. *J Invest Dermatol* 113:156-161, 1999.
- Lockshin NA. Tinea versicolor masquerading as vitiligo. *Cutis* 12:245-247, 1973.

- Machowinski A, Krämer HJ, Hort W, Mayser P. Pityriacitrin--a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses* 49:388-392, 2006.
- Magdolen V, Oechsner U, Trommler P, Bandlow W. Transcriptional control by galactose of a yeast gene encoding a protein homologous to mammalian aldo/keto reductases. *Gene*, 90:105-114, 1990.
- Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Med Microbiol* 49:29-35, 2000.
- Marples MJ. The incidence of certain skin diseases in western Samoa: a preliminary survey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 44:319-332, 1950.
- Mayser P, Rieche I. Rapid reversal of hyperpigmentation in pityriasis versicolor upon short-term topical cycloserine application. *Mycoses* 52:541-543, 2009.
- Mayser P, Lang SK, Hort W. Pathogenicity of *Malassezia* yeasts. In: *The Mycota* (Hrsg : Esser,K), Vol VI, Springer, Berlin:115-151, 2008.
- Mayser P, Schafer U, Krämer HJ, Irlinger B, Steglich W. Pityriacitrin -- an ultravioletabsorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 294:131-134, 2002.
- Mayser P, Pape B. Decreased susceptibility of *Malassezia furfur* to UV light by synthesis of tryptophan derivatives. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:315-319, 1998.
- Mayser P, Imkamp A, Winkeler M, Papavassilis C. Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 290:277-282, 1998a.
- Mayser P, Wille G, Imkamp A, Thoma W, Arnold N, Monsees T. Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 41:265-271, 1998b.
- Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K, Gueho E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol* 137:208-213, 1997a.
- Mayser P, Haze P, Pickel M. Polidocanol sensitivity--a possible tool in the differentiation of *Malassezia* spp. *Mycoses* 40:391-395, 1997b.
- McDaniel WE. Tinea versicolor. *Arch Dermatol* 113:519-520, 1977.
- McGinley KJ, Lantis LR, Marples RR. Microbiology of tinea versicolor. *Arch Dermatol* 102:168-171, 1970.
- McGinley KJ, Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff, and seborrheic dermatitis. *J Invest Dermatol* 64:401-405, 1975.
- Mewes HW, Frishman D, Güldener U, Mannhaupt G, Mayer K, Mokrejs M, Morgenstern B, Münsterkötter M, Rudd S, Weil B. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* 30:31-34, 2002.
- Miranda KC, de Araujo CR, Soares AJ, de Aquino LJ, Souza LK, do Rosario Rodrigues SM. Identification of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Goiania-GO. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:582-583, 2006.
- Mittag H. Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. *Mycoses* 38:13-21, 1995.
- Morishita N, Sei Y. Microreview of Pityriasis versicolor and *Malassezia* species. *Mycopathologia* 162:373-376, 2006.

- Murai T, Nakamura Y, Kano R, Watanabe S, Hasegawa A. Differentiation of *Malassezia furfur* and *Malassezia sympodialis* by glycine utilization. *Mycoses* 45:180-183, 2002.
- Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* 38:337-341, 2000.
- Nardoni S, Mancianti F, Corazza M, Rum A. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathologia* 157:383-388, 2004.
- Nia A, Smith E. Pityriasis versicolor of the glans penis. *Br J Vener Dis* 55:230, 1979.
- Noble WC, Midgley G. Scalp carriage of *Pityrosporum* species: the effect of physiological maturity, sex and race. *Sabouraudia* 16:229-232, 1978.
- Norbeck J, Blomberg A. The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16:121-137, 2000.
- Olumide YM, Odunowo BD, Odiase AO. Depigmentation in black African patients. *Int J Dermatol* 29:166-174, 1990.
- Onishi Y, Kuroda M, Yasueda H, Saito A, Sono-Koyama E, Tunasawa S, Hashida-Okado T, Yagihara T, Uchida K, Yamaguchi H, Akiyama K, Kato I, Takesako K. Two-dimensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 261:148-154, 1999.
- del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Figueras-Salvat MJ, Esteban-Moreno J, Lopez-Gomez S. Changes in fungal ultrastructure after short-course ciclopiroxolamine therapy in pityriasis versicolor. *Clin Exp Dermatol* 15:95-100, 1990.
- Pardo-Castello V. Achromia parasitaria. *Arch Derm Syph* 25:785-789, 1932.
- Paulino LC, Tseng CH, Blaser MJ. Analysis of *Malassezia* microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex real-time PCR. *FEMS Yeast Res* 8:460-471, 2008.
- Nazarro-Porro MN, Passi S, Caprill F, Nazzaro P, Morpurgo G. Growth requirements and lipidmetabolism of *Pityrosporum orbiculare*. *J Invest Dermatol* 66:178-182, 1976.
- Nazarro-Porro MN, Passi S, Caprilli F, Mercantini R. Induction of hyphae in cultures of *Pityrosporum* by cholesterol and cholesterol esters. *J Invest Dermatol* 69:531-4, 1977.
- Prohic A, Ozegovic L. *Malassezia* species isolated from lesional and non-lesional skin in patients with pityriasis versicolor. *Mycoses* 50:58-63, 2007.
- Rasool O, Zargari A, Almqvist J, Eshaghi H, Whitley P, Scheynius A. Cloning, characterization and expression of complete coding sequences of three IgE binding *Malassezia furfur* allergens, Mal f 7, Mal f 8 and Mal f 9. *Eur J Biochem* 267:4355-4361, 2000.
- Rawat S, Stemmler TL. Key players and their role during mitochondrial iron-sulfur cluster biosynthesis. *Chemistry* 17:746-753, 2011.
- Razack EMA, Thambiah A. A clinical study of pityriasis versicolor in Madras. *Med Mycol*, 15:305-311, 1977.
- Razanakolona I, Rakotozandrindrainy N, Razafimahefa J, Andriatsilavo T, Grosjean P, Contet-Audonneau N. Pityriasis versicolor à Antananarivo: première étude sur l'identification d'espèces de *Malassezia* responsables. *J Mycol Med* 14:152, 2004.
- Roberts SO. *Pityrosporum orbiculare*: incidence and distribution on clinically normal skin. *Br J Dermatol* 81:264-269, 1969.

- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkotter M, Mewes HW. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* 32:5539-5545, 2004.
- Ruete A. Pityriasis versicolor. In: Jadassohns Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten (Hrsg : Jadassohns, J), Bd 11, Berlin, Springer Verlag:696-710, 1928.
- Ruete A. Zur Frage der depigmentierenden Pityriasis versicolor. *Dermatol Wochenschr* 96:333-336, 1933.
- Rüchel R, de Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. 1992. *Candida* acid proteinases. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1:123-32, 1992.
- Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Cunliffe WJ, Ingham E. Cell-mediated immunity to the mycelial phase of *Malassezia* spp. in patients with pityriasis versicolor and controls. *Br J Dermatol*, 144:77-84, 2001a.
- Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Holland KT, Ingham E. Production of the mycelial phase of *Malassezia* in vitro. *Med Mycol* 39:487-493, 2001b.
- Salah SB, Makni F, Marrakchi S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Bouassida S, Zahaf A, Ayadi A. Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. *Mycoses*, 48:242-5, 2005.
- Sánchez-Martínez C, Pérez-Martín J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 4:214-21, 2001.
- Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10206-10211, 1999.
- Schmidt M, Zargari A, Holt P, Lindbom L, Hellman U, Whitley P, van dP, I, Harfast B, Scheynius A. The complete cDNA sequence and expression of the first major allergenic protein of *Malassezia furfur*, Mal f 1. *Eur J Biochem* 246:181-185, 1997.
- Shifrine M, Marr AG. The requirement of fatty acids by *Pityrosporum ovale*. *J Gen Microbiol* 32:263-270, 1963.
- Shokohi T, Afshar P, Barzgar A. Distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor in Northern Iran. *Indian J Med Microbiol*, 27:321-324, 2004.
- Simmons RB, Ahearn DG. Cell wall ultrastructure and diazonium blue b reaction of *Sporopachydermia quercuum*, *Bullera tsugae*, and *Malassezia* spp. *Mycologia* 79:38-43, 1987.
- Simmons RB, Gueho E. A new species of *Malassezia*. *Mycol Res* 94:1146-1149, 1990.
- Sloof, W.CH.: Genus *Pityrosporum*. Sabouraud In: The Yeast - A taxonomic study (Hrsg. J. Lodder) 2nd edition, Amsterdam: North- Holland Publishing Company, pp. 1167-1186, 1970
- Smith E. Pityriasis versicolor of the penis. *Br J Vener Dis* 54:441, 1978.
- Stein DH. Superficial fungal infections. *Pediatr Clin North Am* 30:545-561, 1983.
- Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 48:579-583, 2004.
- Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 41:4695-4699, 2003.

Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J Clin Microbiol 40:1363-1367, 2002.

Sunenshine PJ, Schwartz RA, Janniger CK. Tinea versicolor. Int J Dermatol 37:648-655, 1998.

Swift JA, Dunbar SF. Ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *Pityrosporum canis*. Nature 206:1174-1175, 1965.

Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, Zomorodian K, Saadat F, Zeraati H, Hallaji Z, Rezaie S. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. BMC Dermatol 4:5, 2004.

Thoma W. Tryptophanstoffwechsel von *Malassezia furfur*: Isolierung des ersten Metaboliten Malassezin. Inaugural Dissertation. Justus-Liebig-Universität Giessen, 2003.

Thoma W, Krämer HJ, Mayser P. Pityriasis versicolor alba. J Eur Acad Dermatol Venereol 19:147-152, 2005.

Thompson E, Colvin JR. Composition of the cell wall of *Pityrosporum ovale* (Bizzozero) Castellani and Chalmers. Can J Microbiol 16:263-265, 1970.

Vöhrs ISG. Wirkung von Transaminaseinhibitoren auf die Tryptophan-abhängige Pigmentbildung von *Malassezia furfur*. Inaugural Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, 2010

von Gudden B. Beitrag zur Lehre von den durch Parasiten bedingten Hautkrankheiten. II. Pityriasis versicolor. In: Archiv für physiologische Heilkunde (Hrsg : Vierordt, K), Bd 12, Stuttgart: Ebner & Seubert:496-505, 1853.

Wei B, Dalwadi H, Gordon LK, Landers C, Bruckner D, Targan SR, Braun J. Molecular cloning of a *Bacteroides caccae* TonB-linked outer membrane protein identified by an inflammatory bowel disease marker antibody. Infect Immun, 69:6044, 2001.

Wertheim L. Über Lichtwirkung und Leukoderma bei Pityriasis versicolor. Derm Zeitschrift 38:343-354, 1928.

White SD, Vandenabeele SI, Drazenovich NL, Foley JE. *Malassezia* species isolated from the intermammary and preputial fossa areas of horses. J Vet Intern Med 20:395-398, 2006.

Wilde PF, Stewart PS. A study of the fatty acid metabolism of the yeast *Pityrosporum ovale*. Biochem J 108:225-231, 1968.

Willan, R.: Description and treatment of the cutaneous diseases. Order II. Scaly diseases of the skin. London: pp. 192-196, 1801.

Wille G, Mayser P, Thoma W, Monsees T, Baumgart A, Schmitz HJ, Schrenk D, Polborn K, Steglich W. Malassezin--A novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. Bioorg Med Chem 9:955-960, 2001.

Woolford CA, Daniels LB, Park FJ, Jones EW, Van Arsdell JN, Innis MA. The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. Mol Cell Biol, 6:2500-2510, 1986.

Xu J, Saunders CW, Hu P, Grant RA, Boekhout T, Kuramae EE, Kronstad JW, Deangelis YM, Reeder NL, Johnstone KR, Leland M, Fieno AM, Begley WM, Sun Y, Lacey MP, Chaudhary T, Keough T, Chu L, Sears R, Yuan B, Dawson TL, Jr. Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 104:18730-18735, 2007.

Yasueda H, Hashida-Okado T, Saito A, Uchida K, Kuroda M, Onishi Y, Takahashi K, Yamaguchi H, Takesako K, Akiyama K. Identification and cloning of two novel allergens from the lipophilic yeast, *Malassezia furfur*. Biochem Biophys Res Commun 248:240-244, 1998.

Zarnack K, Eichhorn H, Kahmann R, Feldbrügge M. Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. Mol Microbiol, 69:1041-1053, 2008.

Zuther K, Mayser P, Hettwer U, Wu W, Spiteller P, Kindler BL, Karlovsky P, Basse CW, Schirawski J. The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol 68:152-172, 2008.

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Unna, den 10.01.2014

Ilka Simon

Danksagung:

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Mayser für die Überlassung dieses spannenden und überaus interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der für die Arbeit benötigten Mittel und natürlich für das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. Baljer danke ich außerordentlich für seine stets sehr gute und zuverlässige Betreuung und dafür, dass er mir ermöglicht hat, über dieses interessante Thema forschen und schreiben zu dürfen. Besonders hervorzuheben sind außerdem seine Bemühungen, mir zu helfen, die Dissertation zügig fertigstellen zu können und seine Geduld im Rahmen der Korrekturen.

Bei Herrn Dr. Weiß möchte ich mich ganz herzlich für seine immer freundliche, geduldige und überaus zuverlässige Betreuung und die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Frau Dr. Hort und Frau Dr. Lang danke ich für die gute Betreuung, ihre Unterstützung und ihre zahlreichen Ideen und Denkanstöße. Ohne sie wäre der molekularbiologische Teil dieser Arbeit kaum möglich gewesen. Ihre Begeisterung für die Forschung und die gute Zusammenarbeit hielt trotz mancher erschwelter Bedingungen immer an und hat mich sehr beeindruckt.

Ganz herzlich möchte ich auch Frau Gries und Frau Förste danken für ihre stets gute Zusammenarbeit, ihre Hilfe in allen Lebenslagen, ihre Unterstützung und Geduld und ihre hervorragende Betreuung hinsichtlich des kulturellen Abschnitts meiner Arbeit. Auch neben der Arbeit waren die zahlreichen Gespräche und Ideen von Frau Gries immer eine besondere Bereicherung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Geyer und den Mitarbeitern und Doktoranden aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie für ihre exzellente und überaus professionelle Betreuung. Ohne ihre Hilfe wäre so manche Aufgabe für mich nur sehr schwer durchführbar gewesen. Ich bedanke mich in diesem Zusammenhang auch für die Bereitstellung der Räume und der Geräte.

Allen Mitdoktorandinnen und –doktoranden danke ich für die außergewöhnlich schöne Zeit im Labor mit viel Kaffee und regem Gedankenaustausch. Es hat mir immer sehr viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten!

Ich danke meinen Eltern, meinen Großeltern und meiner Tante Helga von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Unterstützung im Studium, während der Examina und während der Erstellung meiner Doktorarbeit. Danke für euren stetigen Zuspruch und für alles, was ihr mir ermöglicht habt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6153-1



9 78 3 835 19 61 53 1